

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Frieze

Der Einfluss von Glycodelin A auf Dendritische Zellen und die adaptive Immunantwort

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Regina Brunnhuber
aus Starnberg

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Anne Krug
Prof. Dr. Günter Schlimok

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Christoph Scholz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2015

Meinen lieben Eltern

*„ Was der Forscher sucht, mag er als Wahrheit erklären;
was er findet, ist jedoch eine Summe von Wahrheiten,
deren jede eine frühere Wahrheit ersetzt hat,
ohne diese damit zur Unwahrheit oder Lüge gemacht zu haben. "*

(Erwin Chargaff 1989)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Das Paradoxon der Viviparität	3
1.2 Toleranz und Immunogenität	4
1.3 Dendritische Zellen	6
1.4 Dendritische Zellen an der feto-maternalen Interphase	9
1.5 Glycodelin	12
1.5.1 Biochemische Struktur	12
1.5.2 Befruchtung	14
1.5.3 Sekretion	15
1.5.4 Immunsuppression	16
1.6 Thema und Fragestellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.2 Reagenzien	22
2.2.1 Chemikalien	22
2.2.2 Medien, Lösungen, Seren	22
2.2.3 Reagenziensätze	22
2.2.4 Zytokine	23
2.2.5 Antikörper	23
2.3 Aufreinigung von Glycodelin A aus Amnionflüssigkeit	24
2.3.1 Isolation	24
2.3.2 Konzentrationsbestimmung im Protein-Assay nach Bradford	27
2.3.3 Identifikation über Westernblot	27
2.3.4 Ausschluss einer Endotoxinkontamination	29
2.4 Kultivierung von Dendritischen Zellen und Lymphozyten	30
2.4.1 Isolation von Monozyten und Kultivierung Dendritischer Zellen	30
2.4.2 Reifeinduktion und Koinkubation Dendritischer Zellen mit Glycodelin A	31
2.4.3 Lymphozytenanreicherung	32
2.5 Analyseverfahren	32
2.5.1 Phasenkontrastmikroskopie	32
2.5.2 Durchflusszytometrische Analyse ausgewählter Oberflächenmarker	33
2.5.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Endozytoseaktivität	36
2.5.4 Proliferationsbestimmung mit 5`-Bromo-2`-deoxy-Uridin	37
2.5.5 Messung der Zytokinsekretion im Immun-Assay	39
2.6 Statistik	39

3. Ergebnisse	40
3.1 Aufreinigung von Glycodelin A aus Fruchtwasser	40
3.1.1 Fraktionierung in der Chromatographie	40
3.1.2 Detektion im Dot-Blot	41
3.1.3 Identifikation im Westernblot	42
3.1.4 Quantifizierung in der Bradford-Proteinbestimmung	43
3.1.5 Prüfung der Glycodelin-Chargen auf bakterielle Kontamination	43
3.2 Morphologische Charakterisierung Dendritischer Zellen	44
3.2.1 Morphologie im Phasenkontrastmikroskop	44
3.2.2 Morphologie in der Durchflusszytometrie	45
3.3 Funktionelle Charakterisierung Dendritischer Zellen	48
3.3.1 Endozytische Aktivität	48
3.3.2 Lymphoproliferative Aktivität	50
3.3.3 Zytokinsekretion	52
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	54
4. Diskussion	55
4.1 Isolierung von Glycodelin A	55
4.2 Generierung von Dendritischen Zellen	57
4.3 Morphologische Veränderungen Dendritischer Zellen durch Glycodelin A	59
4.4 Funktionelle Veränderungen Dendritischer Zellen durch Glycodelin A	62
4.4.1 Endozytose	62
4.4.2 Lymphozytoproliferative Kapazität	63
4.4.3 Zytokinsekretion	65
4.5 Das Paradoxon der Implantationsphase	67
4.6 Ausblick	69
4.6.1 Perspektiven in der Forschung	69
4.6.2 Perspektiven in der Klinik	70
5. Resümee	74
6. Verzeichnisse	76
6.1 Literaturverzeichnis	76
6.2 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	94
6.3 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	96
7. Danksagung	97
8. Veröffentlichungen	98
9. Lebenslauf	99
10. Eidesstattliche Versicherung	101

1. Einleitung

1.1 Das Paradoxon der Viviparität

Bereits Aristoteles unterteilte in seiner *Historia Animalium* die Reproduktion der Wirbeltiere in ovipar-eilegend und vivipar-lebendgebärend. Im Laufe der Evolution wurde die Viviparität von verschiedenen Wirbeltierklassen, darunter von Reptilien, Amphibien und Fischen erprobt (Blackburn 1998) und erreichte mit der Entwicklung der Plazenta ihre komplexeste Form.

Die immunologische Situation der Gebärmutter ist ein einzigartiger Sonderfall im Organismus höherer Säugetiere, denn embryonale Zellen, sogenannte Trophoblasten (TB), zeigen auf ihrer Oberfläche neben den Molekülen, die durch mütterliches Genom kodiert werden, zur Hälfte väterlich kodierte, für den Mutterkörper fremde Strukturen, auch bezeichnet als Antigene (Ag).

In der hämo-chorialen¹ Plazenta des Menschen ist durch die besonders tiefe Invasion des Trophoblasten in mütterliche Spiralarterien der Gas- und Nährstoffaustausch erleichtert (Carter 2012). Synzytiotrophoblasten bilden intervillös die äußerste Zellschicht des Embryos und die Auskleidung placentärer Lakunen und kommen mit dem mütterlichen Blut über eine große Kontaktfläche in Berührung (siehe Abb.3). Vereinzelt können TB sogar in die maternale Zirkulation übertreten und dort lange Zeiträume überdauern (Moffett et al. 2006; Bianchi et al. 1996). Dieser unmittelbare Kontakt mit dem mütterlichen Immunsystem führt zur Wahrnehmung embryonaler Ag durch spezialisierte Abwehrzellen, den Lymphozyten (Tafari et al. 1995). Dadurch wird jedoch nicht die zu erwartende eliminierende Immunantwort ausgelöst. Das Gegenteil ist der Fall. Die mütterlichen Lymphozyten nehmen einen Ag-spezifischen, anergen Zustand ein und greifen den Embryo nicht an.

Das Bestehen einer Schwangerschaft und das Überleben der Frucht stellen somit ein einzigartiges immunologisches Paradoxon dar, in dem ein als fremd erkanntes „Implantat“ toleriert wird. Der Nobelpreisträger Peter Medawar hat dieses Problem bereits 1953 folgendermaßen formuliert: *„How does the pregnant mother contrive to nourish within itself, for many weeks and months, a fetus that is an antigenically foreign body? (...) The reason why the fetus does not habitually provoke an immunological reaction from its mother may be classified under three headings: (a) the anatomical separation from fetus and mother (b) the antigenic immaturity of the fetus and (c) the immunological indolence or inertness of the mother“* (Billington 2003; Medawar 1953).

Diese außergewöhnliche Toleranz erfordert allerdings keine bloße Indolenz, sondern eine äußerst empfindliche immunologische Balance, in welcher die Frucht in einer immunprivilegierten Nische unter bestimmten Grundbedingungen reifen kann.

¹ Die hämo-choriale Plazenta von Nagetieren und ist durch den direkten Kontakt zwischen mütterlichem Blut und dem embryonalen Trophoblasten gekennzeichnet. Daneben gibt es (z.B. bei Elefanten) endothelio-choriale und (z.B. bei Walen) epithelio-choriale Formen, in denen der TB vom maternalen Blut durch mütterliches Endothel bzw. Epithel getrennt ist (Carter 2012).

Einerseits ist während der Implantation eine exakte Kontrolle der embryonalen Invasion in das mütterliche Gewebe nötig, um schwere Komplikationen wie Blutungen oder im Extremfall ein Durchwachsen der Plazenta durch die Gebärmutterwand zu vermeiden (Bischof et al. 1996; von Rango 2008). Andererseits muss eine suffiziente Abwehr gegen Umweltpathogene gewahrt bleiben, welche Mutter und Embryo schädigen könnten. Wird dieses Gleichgewicht z.B. infektions- oder stressbedingt verschoben, kann daraus eine Immunlage hervorgehen, die zur Abstoßung des Embryos führt (Hudic et al. 2009; Hill et al. 1995; Seavey et al. 2008).

Im Vergleich zu anderen Primaten findet man beim Menschen relativ niedrige Implantationsraten, häufige frühe Schwangerschaftsverluste und eine höhere Rate an Plazentapathologien. Schätzungsweise sind über 20% der erkannten Schwangerschaften von einem spontanen Abort vor der 20. Schwangerschaftswoche betroffen (Griebel 2005). Vor diesem Hintergrund gewinnt die Toleranzbildung und -erhaltung an der Grenzfläche zwischen Mutter und Embryo eine eminente klinische Bedeutung. Zum näheren Verständnis dieser besonderen immunologischen Beziehung ist es hilfreich, einen Blick auf die Grundlagen der Immunantwort und das Phänomen der Toleranz zu werfen.

1.2 Toleranz und Immunogenität

Toleranz ist evolutionsbiologisch nicht neu. Bereits in Einzellern war sie für die Symbiose mit den späteren Organellen wie Chloroplasten oder Mitochondrien erforderlich (Raff et al. 1975). Alle mehrzelligen Organismen enthalten eine immense Anzahl an fremden Strukturen bzw. Antigenen, die keine Immunantwort auslösen. So beherbergt zum Beispiel der Organismus des Menschen ca. zehnmal mehr mikrobielle Kommensalen als körpereigene Zellen. Ein extremes Beispiel für Symbiose ist der Anglerfisch der Tiefsee, bei dem das Weibchen seine wesentlich kleineren Zwergmännchen als implantierte Samenbank mit sich trägt (Bartoli et al. 2006).

Diese streng spezifische Duldung körpereigener oder fremder Strukturen durch Lymphozyten ohne eine destruierende immunologische Reaktion bezeichnet man allgemein als Toleranz². Bei höheren Säugetieren muss die Immunabwehr als komplexes Verteidigungssystem eine Bedrohung erkennen und entscheiden, ob und wie sie reagieren soll. Über die Grundlage dieser Entscheidung wird seit Jahrzehnten diskutiert. Ein langbewährtes und dennoch strittiges Modell der Immunogenität ist das der Selbst- und Fremderkennung³.

Die Selbsterkennung erfolgt durch das spezifische Immunsystem über Oberflächenmoleküle, welche auf kernhaltigen Zellen exprimiert werden und wie ein Personalausweis funktionieren:

² Diese einfache Beschreibung wird der Komplexität des Immunsystems allerdings kaum gerecht. Hinter den Begriffen Toleranz oder T-Zell-Suppression verbirgt sich ein Switch der Effektorzellen, so dass nicht von einem Ausbleiben der Reaktion gesprochen werden kann. Lediglich deren Ausrichtung ändert sich (Matzinger 2007).

³ Der strittige Punkt hierbei ist die Definition des „Selbst“. Das Modell von Pradeu et al. führt als neues Immunogenitäts-Kriterium die Kontinuität des Antigenmusters ein, welches die genomische Determinierung des Begriffes „Selbst“ in Frage stellt und dieses als Produkt immunologischer Interaktionen, jedoch nicht als Grundlage der Immunogenität wertet (Pradeu et al. 2006).

MHC-Moleküle werden genetisch vom Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *Major Histocompatibility Complex*) kodiert und spiegeln Informationen über den Proteinbestand einer Zelle auf deren Oberfläche wieder. Intrazelluläre Peptide werden dabei auf MHC der Klasse I (MHC I) gezeigt, extrazelluläre hingegen auf MHC II. Wahrgenommen werden die präsentierten Moleküle von T-Lymphozyten, welche in der Thymusdrüse einen sogenannten T-Zell-Rezeptor (TCR) entwickeln. Jede individuelle T-Zelle ist in ihrem TCR für genau ein Ag spezifisch.

Die zweite große Zellgruppe der erworbenen oder adaptiven Abwehr wird immunologisch im Knochenmark geprägt: B-Lymphozyten haben lösliche Rezeptoren entwickelt, die ebenso genau für ein Ag spezifisch sind und als Antikörper (Ak) oder Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden.

Lymphozyten, welche auf körpereigene Zellen reagieren, werden im Rahmen der zentralen Toleranz bereits im Thymus eliminiert (Kindret 1977). Trotz dieses als klonale Deletion bezeichneten Prozesses kann es zu einem Entweichen autoreaktiver T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe, z.B. in die Milz oder in Lymphknoten (LK), kommen. Dort wirken die Mechanismen der peripheren Toleranz, um Autoimmunität zu verhindern (siehe Kapitel 1.3).

Janeway entwarf zu der Frage, nach welchen Kriterien das Immunsystem eine Bedrohung wahrnimmt, ein Konzept, in dem das fremde Nicht-Selbst über molekulare Muster, die *Pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) erkannt wird. Sie sind charakteristisch für Mikroben und kommen in körpereigenen Zellen nicht vor (Janeway, Jr. 1992). Nach ihrer Aufnahme durch „Fresszellen“ werden diese extrazellulären Peptide auf MHC II-Molekülen präsentiert.

Für die Immunantwort ist neben der Beschaffenheit eines Pathogens entscheidend, ob und welches Gewebe geschädigt wird (Matzinger 2007). Nach dem *Danger model* von Matzinger werden bei einem Gewebeschaden durch den unkontrollierten Zelltod, die Nekrose, Moleküle aus körpereigenen Zellen freigesetzt, welche im gesunden Organismus ausschließlich gut verpackt im Zellinneren vorkommen und daher normalerweise keinen Kontakt zu Abwehrzellen haben. Diese Moleküle werden als *Danger-associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet und wirken als endogene Alarmsignale (Matzinger 2002; Matzinger 1994).

Als Sensoren für PAMPs und DAMPs fungieren Ag-präsentierende Fresszellen (APCs) der angeborenen Abwehr, welche unspezifisch und sehr schnell reagieren. Diese APCs nisten sich als Wächterzellen im Gewebe ein und sind darauf ausgerichtet, das Pathogen durch Alarmierung der spezifischen Abwehr bei minimaler Gewebeschädigung zu beseitigen. Besonders stark vertreten sind APCs in Schleimhäuten, der Kontaktfläche zur Außenwelt und zu Ag aus der Nahrung im Dünndarm (Brett et al. 1992), Ag aus der Luft in der Lunge (Akbari et al. 2001), auf der Haut (Schuler et al. 1985) und nicht zuletzt mit väterlichen Ag des Embryos in der Gebärmutter Schleimhaut der Schwangerschaft, der Dezidua (Oksenberg et al. 1986).

Die potentesten und wandlungsfähigsten APCs des Immunsystems sind Dendritische Zellen (DCs), deren Funktion entscheidend von ihrer Herkunft und ihrem Reifestadium abhängt (Mellman et al. 2001). Für die Entdeckung Dendritischer Zellen 1973 erhielt der Kanadier Ralph Steinman 2011 – leider posthum – den Nobelpreis für Medizin (Steinman et al. 1973).

1.3 Dendritische Zellen

Im Gegensatz zu Lymphozyten sind DCs als Teil des angeborenen Immunsystems nicht auf ein bestimmtes Ag spezialisiert. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus Stammzellen, wandern als Vorläuferzellen ins Blut und werden von dort zur Kontrolle des Ag-Milieus ins Gewebe rekrutiert. Dabei lassen sich topographisch drei Gruppen unterscheiden: die Langerhanszellen der Epidermis, die myeloiden DCs des peripheren Gewebes und die plasmazytoiden DCs, welche v.a. im Blut und lymphatischen Gewebe vorgefunden werden (Romani et al. 1994).

Im Organismus entsteht so ein dichtes Netzwerk von Wächterzellen, welche durch einen als Endozytose bezeichneten Vorgang extrazelluläre Partikel aus ihrer Umgebung aufnehmen, zerkleinern und für CD4⁺T-Zellen auf MHCII-Molekülen darbieten (Schnurr et al. 2002).

Die Erkennung von PAMPs und DAMPs durch das angeborene Immunsystem geschieht über *Pattern recognition* Rezeptoren (PRRs) auf der Oberfläche von APCs wie Toll-like-Rez. (TLR) (Medzhitov et al. 1997), C-Typ Lektin-Rez. (CLR) für Saccharide (Jiang et al. 1995), Scavenger-Rez. für Lipoproteine (Brown et al. 1979), aber auch mittels intrazellulärer Rezeptoren für in die Zelle eingedrungene Erreger wie Nod-like-Rez. (NLR) (Ferrand et al. 2013) und Rig-like Helikase Rez. (RLRs) für virale Doppelstrang-RNS (Szabo 2013). PRRs lösen zusammen mit Zytokinen wie INF- γ (Banchereau et al. 2000) und T-Zell-Signalen wie dem CD40-Liganden (CD40L), eine zentrale Zustandsänderung der DC aus, die als Ausreifung bezeichnet wird (Caux et al. 1994b).

Im Zuge der Ausreifung verlieren DCs ihre Aufnahmefähigkeit für Ag und erhöhen deren Präsentation, wodurch sie in ihrem MHC-Umsatz arretiert werden und genau die Ag zeigen, von welchen sie am Zeitpunkt des schädigenden Ereignisses umgeben sind. Die Wanderung der DC aus dem Gewebe in Lymphknoten wird durch eine Verringerung ihrer Adhäsionsmoleküle an das umgebende Gewebe, wie E-Cadherinen und CCR5, und eine Erhöhung von Chemokinrezeptoren wie CCR7, welche die Migration triggern, unterstützt (siehe Abb.1b) (Bancherau et al. 2000).

Im LK binden naive T-Zellen, die noch nie Kontakt zu ihrem Ag hatten, mit T-Zell-Rezeptoren an Ag-MHC-Komplexe der DC und erkennen dadurch das für sie spezifische, präsentierte Ag. Handelt es sich dabei um ein Fremdantigen und Gefahrensignal, wird dieses von reifen DCs zusammen mit kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD83 präsentiert, welche auf T-Zellen an CD28 andocken (siehe Abb.2a). Durch diese beiden Signale werden die T-Zellen aktiviert, proliferieren und differenzieren sich unter dem Einfluss von Zytokinen in Helferzellen, welche die spezifische Immunantwort umsetzen (Sallusto et al. 1995) (siehe Abb.1c), aber auch in T-Gedächtniszellen, die Träger der erworbenen Immunität gegen erneute Infektionen.

Allerdings gelangen auch unreife DCs aus dem Gewebe in die LK und führen dort in T-Zellen zum programmierten Zelltod, der Apoptose, oder der Ausbildung Ag-spezifischer Toleranz, so dass der Weg der DCs in Abhängigkeit ihres Reifezustandes – über die Bahnung und Differenzierung naiver T-Zellen – in der Induktion primärer Immunantwort oder in peripherer Toleranz mündet (Hawiger et al. 2001; Rissoan et al. 1999; Steinman et al. 2003).

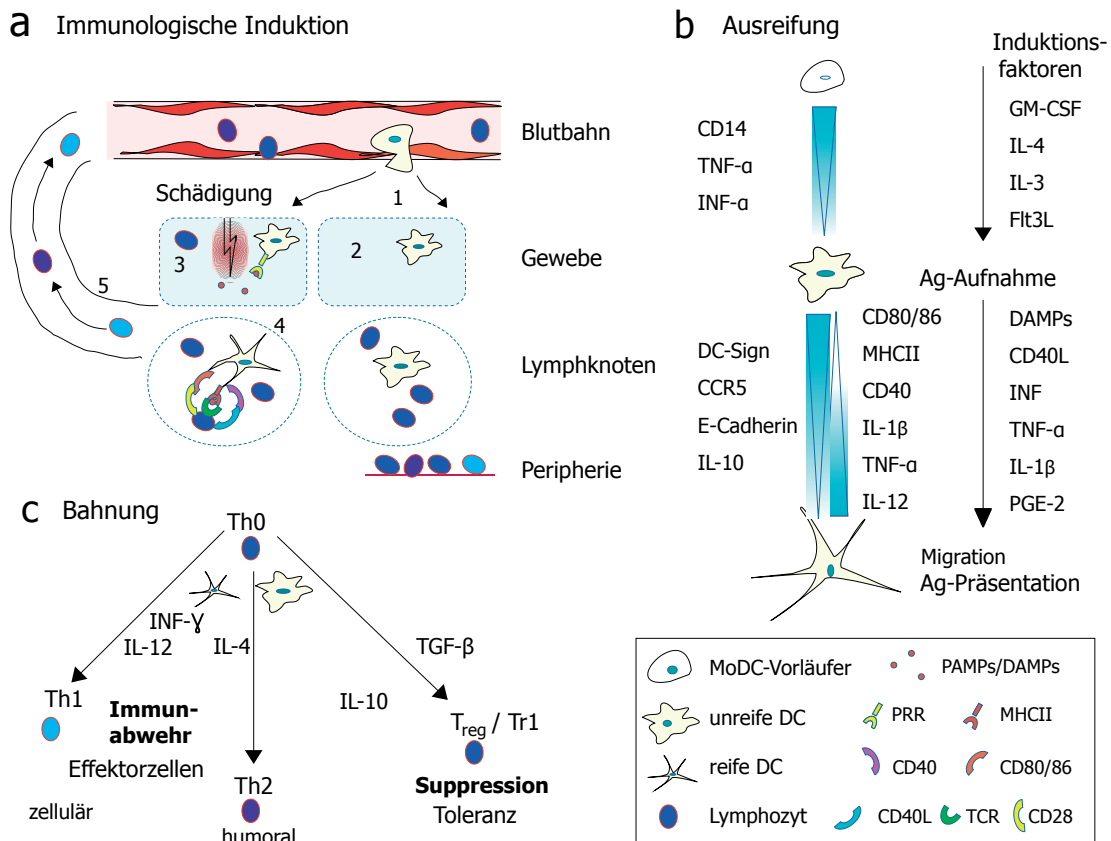


Abb. 1a: Reifeszustände Dendritischer Zellen (modifiziert nach Schnurr et al. 2002):

Eine DC-Vorläuferzelle migriert aus dem Blut in peripheres Gewebe (1), nimmt dort Umgebungspartikel in ihr Zytosol auf, zerlegt Proteine in Peptide und transportiert diese an MHC-Moleküle gebunden an ihre Zelloberfläche (2+3). Bei Aktivierung der DC durch Gefahrensignale, z.B. bei einer Zellschädigung (3), transformiert die DC ihren Funktionszustand und wandert in regionale LK (4). Dort aktiviert sie spezifische T-Lymphozyten, welche über die Blutbahn zum Ort der Schädigung gelangen, um ihre Effektorfunktionen in der Immunantwort zu erfüllen (5). Anergie T-Zellen entstehen durch Interaktion mit nicht aktivierten DCs (6).

1b: Morphologie der DC im Ausreifungsprozess (modifiziert nach Bancherau 2000):

Gezeigt ist die beschriebene Transformation der Vorläuferzelle über die unreife in die reife DC, ausgelöst durch Induktionsfaktoren (rechte Spalte) und messbar an einer Veränderung von Oberflächenmolekülen und der Zytokinsekretion (in der Ausreifung abnehmende Parameter links, zunehmende rechts von den Pfeilen).

1c: Bahnung (*Priming*) naiver T-Zellen:

T-Zellen ohne Ag-Kontakt werden als naiv (Th0) bezeichnet. Durch Ag-Präsentation auf MHCII-Molekülen auf DCs und durch Zytokine differenzieren sie sich in verschiedene Effektor Klassen der CD4⁺T-Helfer-Zellen (Th1, Th2 oder T_{reg}). Th1-Zellen vermitteln die zelluläre Reaktion z.B. bei viralen Infektionen über Zell-Lyse und assistierten Suizid durch Apoptoseinduktion. Th2-Zellen aktivieren die humorale Abwehr über lösliche Antikörper und mikrobizide Enzyme. T_{reg}- und Tr1-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Toleranzentstehung.

Folgende Effektorzellen sind nicht gezeigt: Th17-Zellen gegen Pilzinfektionen und extrazelluläre Bakterien und Th3-Zellen, die Toleranz gegenüber Kommensalen unserer Darmflora vermitteln sowie CD8⁺zytotoxische T-Zellen gegen virale Infektionen.

Abkürzungen: DAMP: *Damage associated molecular pattern*, PRR: *Pattern recognition receptor*, TCR: *T cell receptor*, TNF: Tumornekrosefaktor, IL: Interleukin, INF: Interferon, CCR: Chemokinrezeptor, CD40L: CD40-Ligand, TGF- β , GM-CSF u. Flt3L: Wachstumsfaktoren.

Periphere Toleranz wird durch das Wechselspiel zwischen DCs und regulatorischen T-Zellen aufrechterhalten: Eine Ag-Präsentation durch unreife DCs führt zu Toleranz, reife DCs lösen indessen eine Immunantwort aus (Steinman 2001; Groux et al. 2004). Unter nicht-infektiösen Bedingungen erweisen sich ca. die Hälfte der DCs im LK und nahezu alle DCs im Thymus und der Milz phänotypisch sowie funktionell als unreif (Wilson et al. 2003).

Periphere DCs im Fließgleichgewicht, das heißt ohne Entzündungsvorgänge im umgebenden Gewebe, sind – im Sinne eines Kontinuums – in ihrem Reifungsprozess soweit aktiviert, dass sie intermediäre Level an MHCII und an kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80, CD86 und CD83 exprimieren, jedoch keine Immunantwort induzieren können. Proteine, die in diesem Zustand präsentiert werden, führen bei der T-Zelle zur Anergie (sie reagiert nicht mehr auf ihr spezifisches Ag) (Kundig et al. 1996), oder zum programmierten Zelltod (Kurts et al. 1997). Erst eine vollständige Aktivierung durch DAMPs bzw. PAMPs führt nach konsekutiver Ausreifung zur Immunität (Steinman 2003; Lutz et al. 2002). Eine Zwischenstufe in der DC-Ausreifung wurde auch von Braun vorgeschlagen: DCs verweilen im halbreifen Zustand, um nach einer Revision der Gefahrenlage über die Vollendung des Reifungsprozesses oder die Regression zur funktionell unreifen Zelle zu entscheiden (Braun et al. 2006).

Eine weitere Hypothese geht von einer funktionellen CD11c⁺DC-Subpopulation aus, welche periphere Foxp3⁺regulatorische T-Zellen induzieren kann (T_{reg}) (Yamazaki et al. 2003). Über die Suppression einer CD4⁺T-Zell-Antwort trägt sie entscheidend zur peripheren Toleranz bei. Durch IL-10 fördern DCs die Entwicklung von regulatorischen Tr1-Lymphozyten (Jonuleit et al. 2000), Auch Ag-erfahrene T-Gedächtniszellen können über die Induktion von IL-10 durch DCs polarisiert und so in bereits etablierten Immunreaktionen moduliert werden (Kvale et al. 2007).

Umgekehrt sind T_{reg} Zellen notwendig, um DCs in einem tolerogenen Zustand zu halten (Muth et al. 2012). Diese beiden Zelltypen halten ihre Populationen gegenseitig über eine negative Rückkopplung im Gleichgewicht (siehe Abb. 2b). Das DC-Wachstum hängt dabei von dem Hämatopoetin *FMS like receptor tyrosine kinase 3 ligand* (Flt3L) ab (Liu et al. 2010).

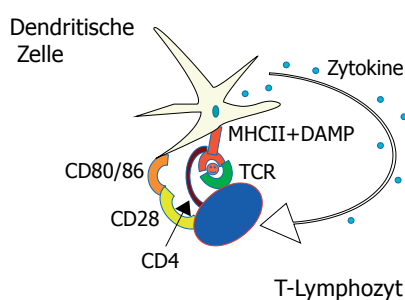
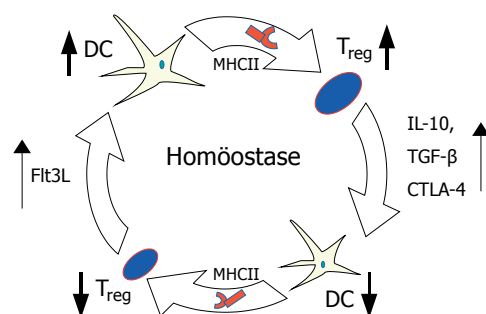


Abb. 2a: Die immunologische Synapse:

Detailldarstellung des Ausschnittes (4) Abb.1a mit den Liganden zwischen DC und T-Lymphozyt: dessen Aktivierung erfordert zwei Signale am TCR und an CD28, sowie Zytokinsignale.



2b: DC und T_{reg} im Gleichgewicht (nach Liu 2010):

Die gezeigte Homöostase entsteht durch eine negative Rückkopplung über Interleukin-10 und die Wachstumsfaktoren Flt3 und TGF-β, sowie die Ag-Präsentation auf MHCII.

1.4 Dendritische Zellen an der feto-maternalen Interphase

In der Entstehung der immunologischen Nische an der Grenzfläche zwischen Fetus und Mutter wird den DCs eine Schlüsselrolle zugeschrieben (Laskarin et al. 2007; Zarnani et al. 2008). Als Bindeglied zwischen dem unspezifischen, angeborenen und dem spezifischen, adaptiven Immunsystem koordinieren sie dabei die räumlichen und zeitlichen Verschiebungen, welche für die Implantation und Progression der Schwangerschaft unabdingbar sind (Blois et al. 2007a).

Versuche an Mäusen haben gezeigt, dass sich eine DC-Depletion negativ auf die Implantation und frühe Plazentaentwicklung auswirkt (Kammerer et al. 2008; Krey et al. 2008).

In der Plazenta sind DCs neben Makrophagen und dem Trophoblasten die Hauptquelle für das Enzym Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) (Munn et al. 2002; Dong et al. 2008), welches über die Katabolisierung von Tryptophan die T-Zell-Proliferation hemmt und dadurch den semi-allogenen Fetus vor Angriffen durch mütterliche T-Zellen schützt (Munn et al. 1998).

Im menschlichen Endometrium wurden neben reifen (Kammerer et al. 2000) auch unreife DCs entdeckt (Gardner et al. 2003). Eine Subpopulation dieser unreifen DCs erscheint ausschließlich während der Dezidualisierung und exprimiert hohe Spiegel an *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin* (DC-Sign), einem C-Typ Lektin, auch bekannt als CD209.

DC-Sign-positive Zellen besitzen eine große Kapazität zur Ag-Bindung (Geijtenbeek et al. 2001) und -Aufnahme (Kerrigan et al. 2009) und können die Proliferation naiver T-Zellen hocheffizient stimulieren. Aufgrund ihres zeitlich begrenzten Vorkommens im dezidualisierten Endometrium wird angenommen, dass ihnen eine entscheidende Bedeutung für das lokale Immunmilieu zwischen Trophoblast und Dezidua zukommt. Eine pathogenetische Relevanz von DC-Sign zeigt sich auch an seiner erhöhten Expression auf DCs bei hypertensiven Schwangerschafts-erkrankungen mit gestörter Plazentation (Scholz et al. 2008).

DC-Sign vermittelt als Adhäsionsmolekül die Interaktion von DCs mit der vorherrschenden Leukozytenpopulation in der frühen Dezidua, den ICAM-3-exprimierenden sogenannte *large granular lymphocytes* (Figdor et al. 2002). Diese uterinen natürlichen Killerzellen (uNKs) können über das Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle CD56⁺⁺ und CD16⁻ identifiziert werden. Sie stehen topographisch in enger Beziehung zu den DCs und erfüllen eine duale Aufgabe: die Überwachung der Integrität der Schleimhaut im Menstruationszyklus und die Kontrolle der Trophoblasteninvasion in die Spiralarterien (Gerosa et al. 2002).

Unreife DCs werden tlw. durch uNKs lysiert (Piccioli et al. 2002). Reife Zellen entgehen dieser Lyse durch verstärkte Präsentation nichtklassischer MHCI-Moleküle, v.a. des Humanen Leukozyten Antigens (HLA) der Klasse E, durch dessen Bindung die Lysefähigkeit von Natürlichen Killerzellen (NKs) inhibiert wird (Della et al. 2003).

Demselben Prinzip folgend exprimieren extravillöse Trophoblasten ein charakteristisches Muster von MHCI-Molekülen, v.a. HLA-C, -G und -E und schützen sich so vor einer Lyse durch NK-Zellen (Hiby et al. 2004).

Die Ausrichtung der DCs unterliegt zahlreichen hormonellen Einflüssen und prägt ihrerseits deren Mikroumgebung durch Sezernierung von Botenstoffen. Die Balance zwischen Th2- und Th1-Effektorzellen hängt von dem sezernierten Zytokinprofil der aktivierten DC ab, welche von dem präsentierten PAMP und der Zytokin- und Hormonumgebung der DC bestimmt wird (Dealtry et al. 2000). Die Exposition zu Schwangerschaftshormonen wie Prostaglandin E₂ (PGE₂) und PGD₂, Progesteron und dem *Leukaemic inhibitory factor* (LIF) verschiebt die Ausreifung der DCs in eine Th2-polarisierende Richtung (Kalinski et al. 1997; Sykes 2012) und der Wachstumsfaktor TGF- β fördert tolerogene DCs (Rutella et al. 2006).

In der Plazenta werden Th2-Zytokine, wie IL-4, IL-10, IL-6 und IL-13, vermehrt gebildet und Th1-Zytokine, wie INF- γ , IL-2, IL-12 und TNF, supprimiert. In Versuchen an Mäusen konnte durch einen Überschuss an Th-1-Zytokinen ein Abort induziert werden, wohingegen eine IL-10-Zufuhr die Abbruchrate verminderte (Chaouat et al. 1995).

Eine erfolgreiche Schwangerschaft wird daher seit Langem als Th2-dominiertes Phänomen begriffen, in welchem Th2-Zytokine protektiv und Th1-Zytokine über die Induktion der zellulären Immunantwort abortinduzierend wirken (Wegmann et al. 1993; Lin et al. 1993).

Die Periode der Implantation ist eine Phase, in der die Invasion des Trophoblasten reguliert werden muss und die embryonalen Zellen erstmals Kontakt zu mütterlichen Immunzellen erlangen. Wichtig sind dabei v.a. Adhäsionsmoleküle, Chemokine, inflammatorische Signale, Differenzierungs- und Vaskularisationsmediatoren. Eine stark vereinfachte Übersicht über das immunologische Milieu gibt Abb.3. Die Dezidua zeichnet sich in dieser Phase, dem sogenannten „Implantationsfenster“, durch eine einzigartige Fähigkeit aus: Sie sezerniert große Mengen immunmodulatorischer Glykoproteine wie z.B. Galektine und Glycodelin.

Galektine stellen eine Gruppe kohlenhydratbindender Proteine dar, welche in der Evolution hochkonserviert sind und bei frühen Schwangerschaftsverlusten in verminderter Expression vorgefunden werden. Ihre Sekretion aus dezidualen Stromazellen ist progesteronabhängig und scheint reziprok die Progesteron-Produktion negativ zu beeinflussen.

Die Bindung von Galektin-1 an ein spezielles Zuckermolekül, das Thomsen-Friedenreich-Disaccharid, auf Trophoblasten hat möglicherweise eine regulatorische Wirkung auf deren Differenzierung (Jeschke et al. 2010), Fusion (Fischer et al. 2011) und Invasivität (Fitzgerald et al. 2010). Weitere wichtige Funktionen liegen in seinen proangiogenetischen und immunmodulatorischen Eigenschaften (Barrientos et al. 2013).

Auch die erwähnte Expression von HLA-G auf Trophoblasten wird durch Galektin-1 gefördert (Tirado-Gonzales et al. 2013). Im Mausmodell spielt Galektin-1 u.a. über die Induktion tolerogener DCs bei der Entwicklung feto-maternaler Toleranz eine entscheidende Rolle und besitzt therapeutisches Potential bei drohender Fehlgeburt (Blois et al. 2007b).

Ähnliche funktionelle Eigenschaften werden auch dem zweiten immunmodulatorischen Glykoprotein in der Implantationsphase zugesprochen: Glycodelin.

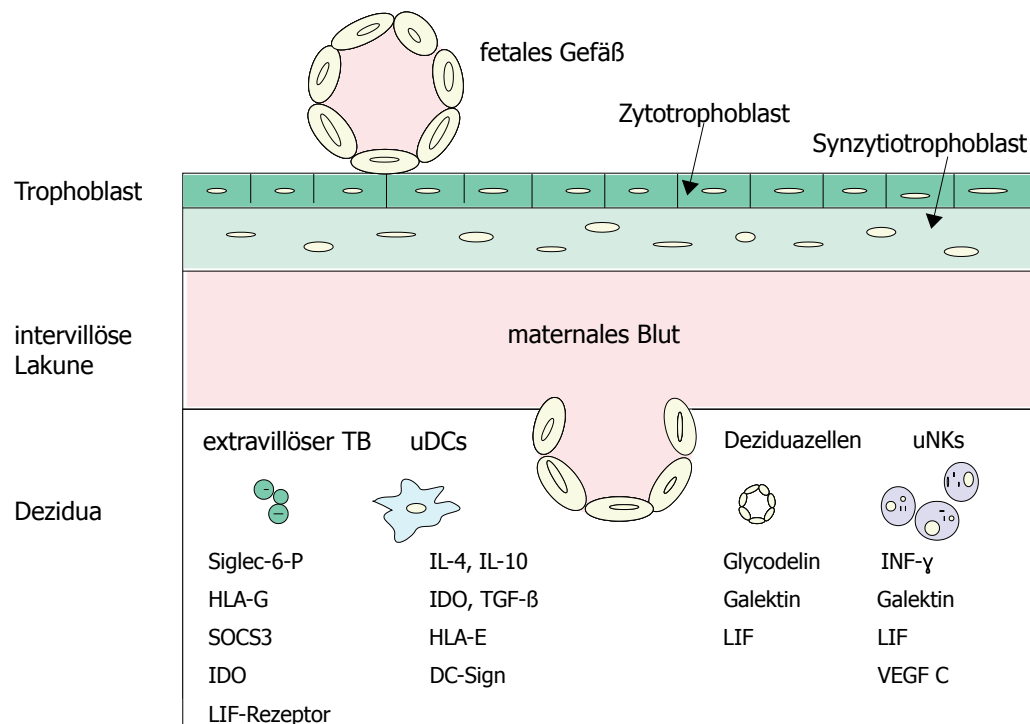


Abb. 3: Immunologisches Milieu der feto-maternalen Interphase (modifiziert nach Toth 2010):

Der Trophoblast kommt im intervillösen Raum in Kontakt mit mütterlichem Blut. Dargestellt sind ausgewählte zelluläre Komponenten der Dezidua, welche das immunologische Milieu durch die unten aufgeführten Faktoren gestalten.

Siglec-6 wird von extravillösen Trophoblasten exprimiert. Über diese extrazellulär regulierte Kinase wird die Begrenzung der Trophoblasteninvasion vermittelt (siehe Kapitel 1.5.4).

HLA-G ist ein nicht-klassisches MHC Klasse I-Molekül, welches sehr restriktiv in bestimmten Geweben wie der Hornhaut des Auges, pankreatischen Inseln, im Thymusmark oder auf Trophoblasten exprimiert wird. Über inhibitorische Rezeptoren kann es mit Lymphozyten, NK und DCs interagieren. So schützt HLA-G den Trophoblasten vor der zytolytischen Funktion von NK und zytotoxischen T-Lymphozyten und hemmt sowohl die Proliferation dieser Immunzellen als auch die Ausreifung Dendritischer Zellen (Carosella et al. 2008).

Die Familie der *Suppressor of cytokine signaling* (**SOCS**) limitiert Zytokineffekte über die Antagonisierung intrazellulärer Signalkaskaden. Ihre Funktion lässt sich an Knockout-Mäusen gut nachvollziehen. SOCS3 kontrolliert und begrenzt z.B. die differenzierungsfördernden Effekte des *Leukemia inhibitory factor* (Fitzgerald et al. 2009).

Leukemia inhibitory factor **LIF** gehört zur IL-6-Familie und wird vom Endometriumepithel in der Periode der Anlagerung des TB an das Endometrium produziert. Es erhöht die Adhärenz des Endometriums an Fibronectin und Kollagen IV, welche auf dem TB neben einem **LIF-Rezeptor** exprimiert werden. LIF stimuliert die adhäsiven Eigenschaften von extravillösen Trophoblasten auch über die Regulation von Adhäsionsmolekülen, sogenannter Integrine, und stimuliert die Invasion des TB (Dimitriadis et al. 2009).

Interferon-Gamma (**INF- γ**) und der proangiogenetische *Vascular endothelial growth factor* (**VEGF**) C werden durch uNKs sezerniert und halten diese in einem nicht-zytotoxischen und proangiogenetischen Zustand, obwohl die uNKs weiterhin toxische Granula und zytotoxische Rezeptoren produzieren und ihr Aggressionspotential beibehalten. Wahrscheinlich üben sie diesen Effekt über eine Veränderung der MHC-I-Moleküle in möglichen uNK-Zielzellen wie invasiven extravillösen Trophoblastzellen und epithelialen Deziduazellen aus, indem sie einen am MHC-Aufbau beteiligten Transporter (TAP-1) induzieren (Kalkunte et al. 2009).

Abkürzungen: HLA-G=Humanes Leukozyten-Ag G; TLR=*Toll like receptor*; SOCS3= *suppressor of cytokine signaling 3*; VEGF=*Vascular endothelial growth factor*; LIF=*Leukemia inhibitory factor*; IFN=Interferon; TAP= *Transporter associated with Ag-processing*.

1.5 Glycodelin

1.5.1 Biochemische Struktur

Glycodelin wurde in den 1970ern und 80ern von verschiedenen Forschern unabhängig voneinander identifiziert und mit verschiedenen Namen bedacht. So wurde es als PP14 (*placental protein 14*) (Bohn et al. 1982), α -*uterine protein* (Horne et al. 1982), PAEP (*progesteron-dependent endometrial protein*) (Joshi 1987; Kamarainen et al. 1994b) und schließlich mit der heute gebräuchlichen Bezeichnung Glycodelin (Gd) (Dell et al. 1995) beschrieben.

Hinter dieser Vielzahl an Synonymen verbirgt sich ein Glykoprotein mit potenten immun-suppressiven und kontrazeptiven Eigenschaften aus der Superfamilie der Lipokaine (Flower 1996) – extrazellulärer Transportproteine für hydrophobe Liganden (Kontopidis et al. 2004).

In den 90ern wurde das Glycodelin-Gen PAEP auf Chromosom 9q34 in der Region der ABO-Blutgruppen entdeckt (Van Cong et al. 1991; Kamarainen et al. 1991). Es umfasst einen Bereich von 5,05 Kilobasen und ist in sieben Exons unterteilt (Vaisse et al. 1990).

Die biochemische Struktur wird durch eine Primärstruktur aus 162 Aminosäuren gebildet, welche in ihrer Sequenz eine außerordentliche Ähnlichkeit zu dem tierischen β -Laktoglobulin aufweist (Huhtala et al. 1987; Bolton et al. 1985; Julkunen et al. 1988) und als Sekundärstruktur ein β -Faltblatt formt (Pala et al. 1997). Über vier intermolekulare Disulfidbrücken zwischen je vier Cysteinresiduen entsteht ein in seiner Tertiärstruktur homodimeres Molekül, welches im Fall von GdA in der Gelfiltration eine Masse von 50-60 Kilodalton (kDa) besitzt und in der Elektrophorese mit 28 kDa als Monomer vorliegt (Rutanen et al. 1987; Bohn et al. 1982).

Im Gegensatz zu β -Laktoglobulin ist Glycodelin verzuckert, wobei die Faltung von der Glykosylierung unbeeinflusst bleibt (Seppala et al. 2002). Auf dem Proteinrückgrat wurden drei potentielle N-verbundene Glykosylierungsstellen gefunden: Asparagin (Asn) 28, Asn 63 und Asn 85, von denen die ersten beiden auch glykosyliert sind (siehe Abb.4).

Gd kommt in verschiedenen Glykosylierungsformen vor, welchen unterschiedliche Expressionsorte zugeschrieben werden können (siehe Tab.1). Die Verzuckerung ist geschlechtsabhängig verschieden, verändert das Molekulargewicht (MG) sowie den isoelektrischen Punkt der Moleküle und ist entscheidend für die Funktion und biologische Aktivität von Glycodelin (Seppala et al. 2007).

So unterscheidet man GdS aus der Seminalflüssigkeit und GdF aus Ovarialfollikeln. GdC wird in den sogenannten Cumuluszellen gebildet, welche die Eizelle umgeben und GdO kann aus Aszites von Patientinnen mit Ovarial-Ca isoliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Glykosylierungsform Glyodelin A untersucht, welche von Deziduazellen sezerniert wird und aus Fruchtwasser isoliert werden kann.

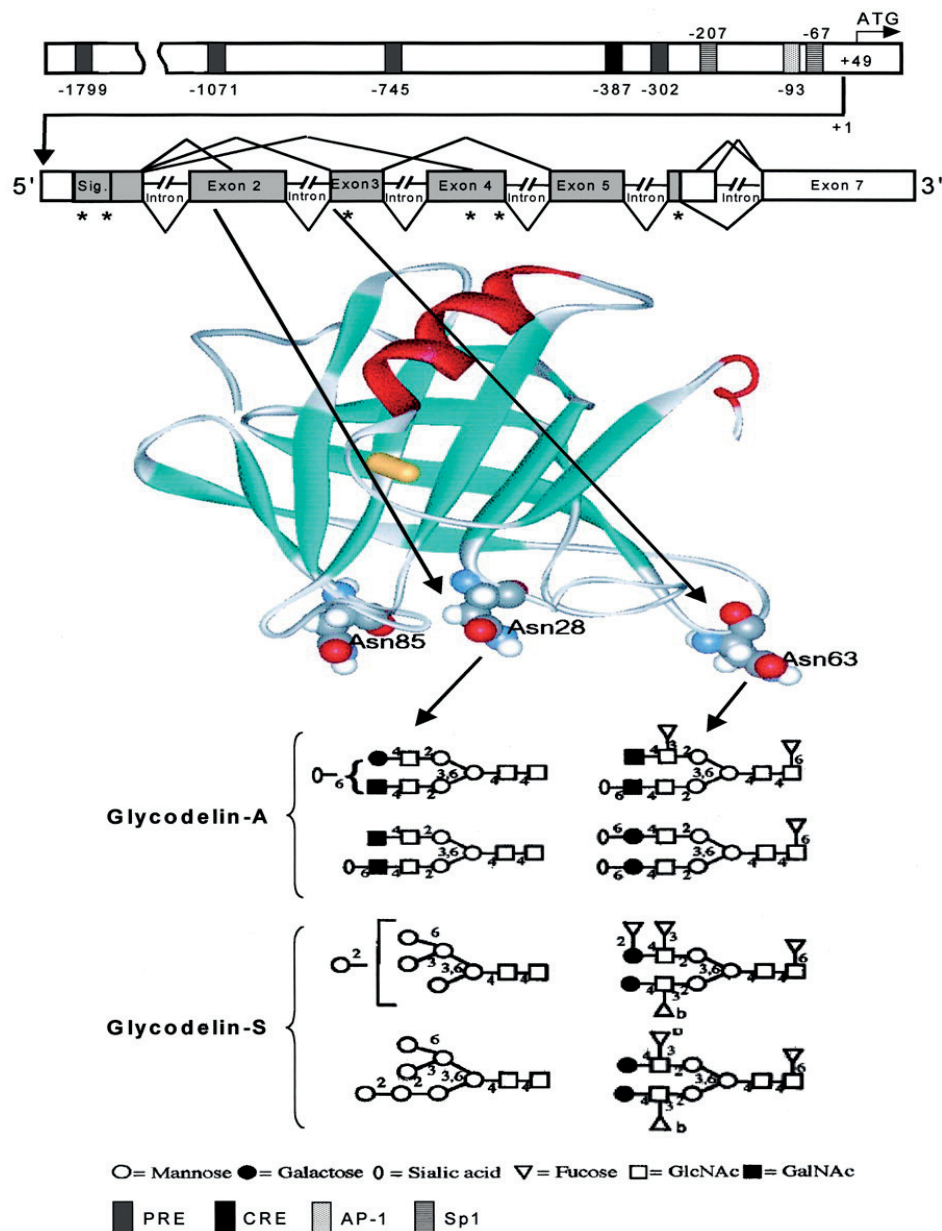


Abb. 4: Molekularstruktur des Glycodelins (Seppala et al. 2002):

Im oberen Teil ist die Promotorregion des Gd-Gens PAEP und darunter das Splicingmuster des Transkripts gezeigt. Pfeile weisen von den kodierenden Stellen auf die Glykosilierungsstellen der Tertiärstruktur eines Gd-Monomers. Die Disulfidbrücke ist als gelber Zylinder dargestellt. Die Hauptglycane der Glykosilierung sind darunter für GdA und GdS zu sehen.

Der Kohlenhydratanteil von GdA macht 17,5% seines Molekulargewichtes aus und hat einen hohen Mannoseanteil. Bindungspartner für beide Glykosilierungsstellen sind v.a. komplexe Glycane in Form zweiantenniger Oligosaccharide, die aus sialysierten oder fukosylierten GalNAc β (1-4), sowie Lewis X (Le^x) oder GlcNAc (LacDiNAc) Sequenzen bestehen (Dell et al. 1995). Diese sind bei Wirbeltieren äußerst selten zu finden und entscheidend für die vielfältigen Funktionen von GdA (Morris et al. 1996), welche zwei Hauptbereichen zuzuordnen sind: dem Befruchtungsvorgang und der Immunsuppression. Im Folgenden sollen die bisherigen Erkenntnisse dazu in ihren Grundzügen beleuchtet werden.

1.5.2 Befruchtung

Der Vorgang der Befruchtung veranschaulicht, wie die Aktivität von Gd durch Variationen der Verzuckerung moduliert wird (siehe Abb.5).

Bei der Ejakulation treten die Spermatozoen in Kontakt mit GdS aus der Seminalflüssigkeit. GdS verhindert die Kapazitation, eine zur Penetration in die Eizelle notwendige, biochemische Umwandlung der Samenzelle (Austin 1951). Während der Passage durch die Zervix wird GdS vom Spermiumkopf gelöst und die Kapazitation findet statt (Chiu et al. 2005). Im Eileiter schützen die immunsuppressiven Isoformen GdA und GdF das Spermium vor dem weiblichen Immunsystem. Gleichzeitig verhindern sie die Spermienbindung an die Schutzhülle der Eizelle, die Zona pellucida sowie eine vorzeitige Akrosomenreaktion (Chiu et al. 2003; Oehninger et al. 1995). Unter letzterer versteht man die Freisetzung von Enzymen aus dem Spermiumkopf mit folgender Auflösung der Zona pellucida. Bei dem Durchtritt durch die Corona radiata, eine die Eizelle umgebende Zellschicht, werden GdA und GdF in die kleinere Isoform GdC umgewandelt. Dabei ändert sich die Glykosilierungsstruktur, das Proteinrückgrat jedoch bleibt unbeeinflusst (Yeung et al. 2006). Diese Umformung verändert die Lektinbindungseigenschaften und erhöht die Bindungsfähigkeit der Spermatozoen an die Zona pellucida (Chiu et al. 2007).

Insgesamt betrachtet wirkt GdA im Befruchtungsvorgang regulierend, während es für die Implantation eine wichtige Bedingung darstellt.

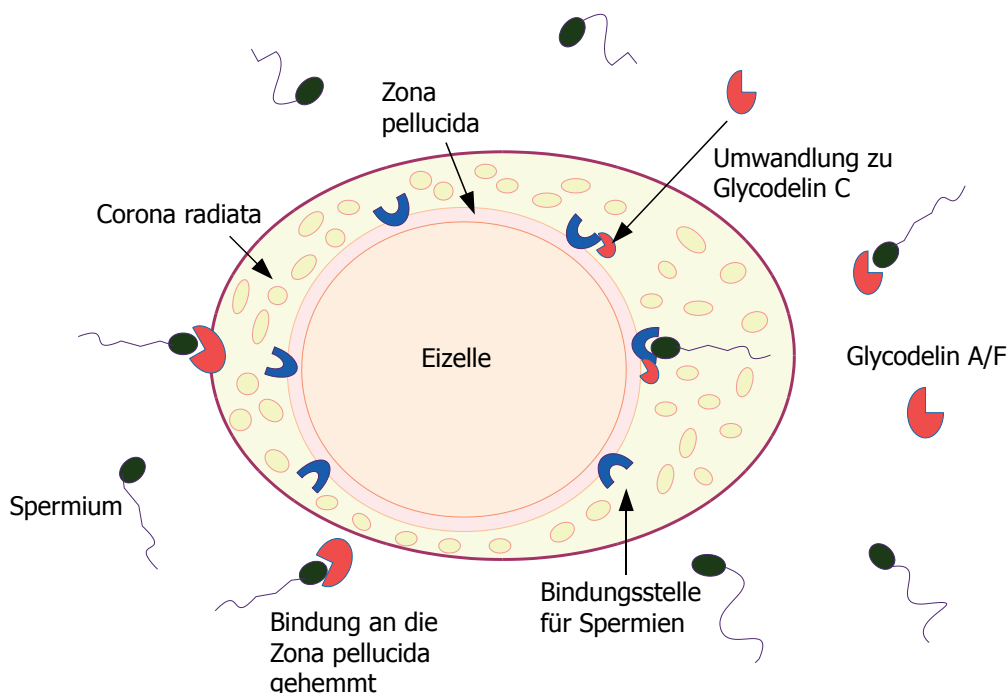


Abb. 5: Glycodelin im Befruchtungsvorgang:

GdA und GdF schützen das Spermium vor dem mütterlichen Immunsystem und verhindern die Spermienbindung an die Zona pellucida. Die Umwandlung in GdC in der Corona radiata ermöglicht durch eine gesteigerte Bindungsfähigkeit an die Zona pellucida die Befruchtung.

1.5.3 Sekretion

Die durch GdA gewährleistete Prävention überzähliger Befruchtungen während der frühen Schwangerschaft und dem größten Teil des weiblichen Zyklus spiegelt sich in seinem Sekretionsmuster wieder: Immunhistochemische Färbungen detektieren eine Gd-Sekretion aus endometrialen Drüsen der sekretorischen Zyklusphase, sowie aus dem Drüsenepithel der dezidualen Spongiosa (Seppala et al. 1988).

In der Proliferationsphase kann – nach den ersten drei Tagen, an welchen Gd in den basalen Drüsen gemessen wird – kein Gd nachgewiesen werden, ebenso wenig während des periovulatorischen Mittzyklus. Der früheste Zeitpunkt für eine positive endometriale Gd-Detektion ist der 3-5. Tag post ovulationem. Die Expression steigt an, bis am 10. Tag nach der Ovulation alle Drüsen stark positiv sind. Das Maximum liegt mit 7,7 mg Gd pro Gramm Probenmaterial in der späten Sekretionsphase (Julkunen et al. 1986a).

Ein ähnliches Muster ist in der uterinen Flüssigkeit wiederzufinden. Hier sind die ersten Gd-Konzentrationen am 6. Tag nach dem Peak des Luteotropen Hormons (LH+6) messbar und erreichen in der späten sekretorischen Phase ein Hundertfaches der Serumkonzentration (Li et al. 1993b). Gut detektierbare Gd-Konzentrationen in der uterinen Flüssigkeit sind mit einer normalen histologischen Endometriumentwicklung in der Periimplantationsphase assoziiert (Li et al. 1993a).

Gegen Ende der uterinen Rezeptivität von LH+5 bis LH+11 (Bergh et al. 1992) entsteht durch die erhöhte Gd-Sekretion in der Gebärmutter ein kontrazeptives Mikroklima.

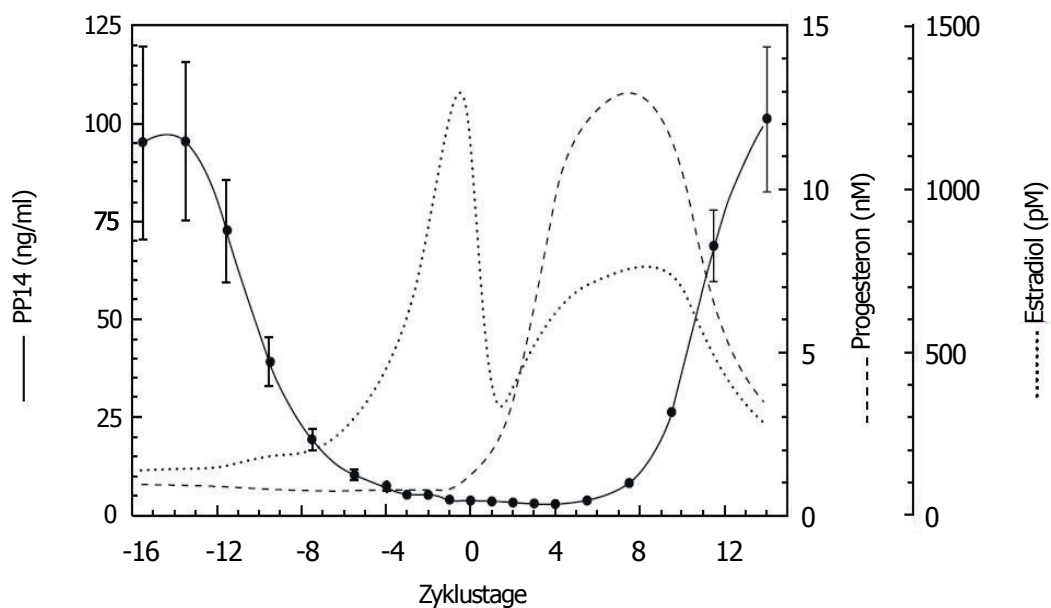


Abb. 6: Sekretionsmuster von Glycodelin (Bersinger et al. 2009):

Konzentration von Gd (PP14) in der peripheren Zirkulation während eines normalen ovulatorischen Menstruationszyklus in 36 gesunden Frauen.

In der Schwangerschaft steigt die Konzentration im Serum zwischen der 6. und 12. Woche bis auf das 50-Fache der Werte einer nichtschwangeren Frau (ca. 2200 µg/l) an, um nach der 16. Woche wieder abzusinken.

Die Konzentration von Gd in der Amnionflüssigkeit ist während der Schwangerschaft stets deutlich höher als im Serum, mit einem Maximum im ersten Trimenon in der 12.-20. Woche (232 mg/l) (Julkunen et al. 1985).

Die Gd-Sekretion durch endometriale Epithelzellen unterliegt hormonellen Einflüssen. Die wichtigsten stimulierenden Faktoren sind dabei Progesteron und Progestogen (Taylor et al. 1998). Weitere Kandidaten für die Steuerung der Glycodelin-Sekretion sind Relaxin (Seppala et al. 2001) und humanes Choriongonadotropin (hCG) (Hausermann et al. 1998).

Umgekehrt wurde gezeigt, dass GdA die Produktion von hCG, Progesteron und Östrogen in Zytotrophoblasten dosisabhängig steigert. Diese Parameter sind Indikatoren für den Differenzierungsprozess vom Zytotrophoblasten zum Synzytiotrophoblasten. GdA moduliert dabei wahrscheinlich die Differenzierung (Jeschke et al. 2005b) und nimmt Einfluss auf die Hormonproduktion des Trophoblasten (Jeschke et al. 2005a).

Das zeitliche und räumliche Vorkommen von Gd ließ Clark bereits 1996 dessen zentrale Position in der feto-maternalen Immunologie vermuten und führte zu seiner „*human feto-embryonic defence system hypothesis*“ (Clark et al. 1996).

1.5.4 Immunsuppression

Die immunsuppressiven Eigenschaften von Glycodelin wurden von Bolton in gemischten Lymphozytenkulturen beobachtet (Bolton et al. 1987) und machen es zu einem wichtigen Faktor in der erfolgreichen Implantation und der Bewahrung der Frucht durch die Entwicklung Ag-spezifischer maternaler Toleranz.

Wie andere Oligosaccharide mit fukosylierten LacDiNac-Antennen ist GdA in der Lage, die Selektin-vermittelte Adhäsion von Leukozyten zu unterbinden (Jeschke et al. 2003). Dieser Mechanismus könnte auch die Anlagerung von mütterlichen Leukozyten an den Trophoblasten betreffen (Jeschke et al. 2010).

In T-Lymphozyten wird durch GdA die Proliferationsinduktion durch Phytohämagglutinin blockiert (Pockley et al. 1988) und deren IL-2 Produktion vermindert (Pockley and Bolton 1989). Dieser inhibitorische Effekt kommt durch eine Desensibilisierung der T-Zell-Rezeptoren (TCR) zustande (Rachmilewitz et al. 2001), welche auch eine Veränderung des Expressionsmusters für Zytokine nach sich zieht. Dabei wirkt Gd synergistisch mit IL-4 und unterdrückt v.a. die Zytokinexpression durch T-Helferzellen vom Typ 1 wie z.B. INF-γ. Diesen Effekt entfaltet Gd u.a., indem es die durch TCR-Triggerung induzierte Repression des Transkriptionsfaktors GATA-3, eines Regulators der Th2-Differenzierung, inhibiert (Mishan-Eisenberg et al. 2004).

Ein apoptoseinduzierender Effekt auf aktivierte CD4⁺T-Lymphozyten scheint von dem Proteinrückgrat des Moleküls auszugehen (Jayachandran et al. 2004) und nur bei entsprechender Syialisierung zum Tragen zu kommen (Mukhopadhyay et al. 2004). Dieser Umstand könnte durch eine glykosilierungsabhängige Erreichbarkeit der Apoptoseregion auf dem Gd-Molekül erklärt werden (Poornima et al. 2007).

In zytotoxischen CD8⁺T-Lymphozyten verringert GdA die Transkription zytolytischer Proteine, wie Perforin und Granzyme B, und reduziert die Degranulation zytolytischer Vesikel (Soni and Karande 2010).

Ca 70% der dezidualen Lymphozyten des ersten Trimesters sind natürliche Killerzellen, welche nach Kontakt mit einem unbekannten Ag direkt zytolytisch wirken und auch die befruchtete Eizelle lysieren könnten (Nishikawa et al. 1991; Moffett-King 2002). GdA blockiert die Fähigkeit von NKs, undifferenzierte Zielzellen zu lysieren (Okamoto et al. 1991). Im peripheren Blut erhöht GdA in NKs die Sekretion von IL-6, IL-13 und *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) bereits ab einer GdA-Konzentration von 0,1 µg/ml (Lee et al. 2010).

Die erwähnte Subpopulation der CD56-positiven uterinen NK-Zellen produziert selbst Gd (Koopman et al. 2003), kontrolliert die Invasion des Trophoblasten und schirmt diesen vor dem mütterlichen Immunsystem ab. Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren sind uNKs in die Restrukturierung der Spiralarterien miteinbezogen (Burke et al. 2010).

B-Lymphozyten erfahren durch Gd eine Proliferationshemmung und reduzieren sowohl die Expression von MHCII als auch die Sekretion von Ig M (Yaniv et al. 2003).

In Monozyten bindet Gd an das Oberflächenmolekül CD14 (Miller et al. 1998), wodurch die Migration blockiert und die APCs in unmittelbarer Nachbarschaft der GdA-sezernierenden Zellen konzentriert werden. Entgegen früherer Studien konnte eine proapoptotische Genkaskade in Monozytenzelllinien nach GdA-Stimulation identifiziert und auch eine proliferationshemmende Wirkung festgestellt werden (Alok et al. 2009; Tee et al. 2008).

Als Adhäsionsprotein für die Anlagerung des Embryos an die endometrialen Drüsen ist GdA möglicherweise am ersten Schritt der Implantation beteiligt (Uchida et al. 2007a).

Die Invasion des Trophoblasten scheint GdA über die Suppression der Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 zu limitieren (Lam et al. 2009). Eine neuere Studie konnte zeigen, dass dieser Effekt über einen GdA-Rezeptor auf Trophoblasten, dem Siglec-6-Protein und eine extrazellulär regulierte Kinase (ERK) mit c-Jun-Signalweg zustande kommt, welcher ebenfalls durch GdA herabreguliert wird (Lam et al. 2011).

Der Einfluss von Gd auf das deziduale Immunmilieu konnte in unserem Labor anhand der Gd-Konzentration in der Dezidua nachvollzogen werden. Im Falle einer gestörten Plazentation mit resultierendem Abort war diese im Vergleich zu einer normalen Schwangerschaft erniedrigt. Bei Vorliegen einer Molenschwangerschaft, bei der nur die Fruchthülle und die Plazenta ausgebildet werden, ohne dass sich ein Embryo entwickelt, war die Gd-Konzentration dagegen in den ersten acht Wochen deutlich erhöht (Toth et al. 2008).

Neben den beschriebenen Hauptfeldern der Glycodelinwirkung bestehen Hinweise auf eine Rolle in der Angiogenese und Zelldifferenzierung, sowie im Zellwachstum (Ohta et al. 2008; Jeschke et al. 2005c) und im Bereich der Tumormimmunologie.

Der Einfluss des Glycodelins auf Dendritische Zellen ist bisher noch nicht beschrieben und wurde von unserer Arbeitsgruppe erstmals untersucht.

Isoform	Vorkommen	Hauptglycane	Referenz
GdA (amniotisch)	Fruchtwasser, sekretorisches Endometrium, Dezidua	N28: Oligomannose, hybride und komplexe Glycane mit sialysierten LacDiNac- Sequenzen N63: komplexe Glycane mit sialysierten und fukosylierten LacDiNac- Sequenzen, Lewis ^x	(Riittinen et al. 1989b); (Julkunen et al. 1986b; Julkunen 1986)
GdS (seminal)	Seminalplasma, Seminal- bläschen	N28: Oligomannosestrukturen N63: komplexe Glycane mit hoch fukosylierten Lewis ^x , Lewis ^y	(Julkunen et al. 1984)
GdF (follikulär)	Ovar follikuläre Flüssigkeit	möglicherweise ähnlich zu GdA, GcINAc-Reste [↑]	(Kamarainen et al. 1996; Tse et al. 2002)
GdC (cumulus- oophorus- assoziiert)	Kumulus- Zellmatrix	noch unbekannt	(Tse et al. 2002; Yeung et al. 2006)
GdO (ovariell)	Aszites, Ovarial- Carcinom	sLe ^x und sLe ^a [↓] Thomsen- Friedenreich-Ag [↑] Glykosilierung [↓]	(Jeschke et al. 2009)
Unbekannte Isoformen	Knochenmark Periphere mononukleäre Zellen Deziduale NK Ekrine Drüsen	noch unbekannt	(Morrow et al. 1994; Kamarainen et al. 1994) (Lang and Venkatraman 2007) (Kamarainen et al. 1997)

Tabelle 1: Glykosilierungsformen des Glycodelins und ihr Vorkommen:

Die Symbole ^{↑↓} geben die Hauptglycane in Relation zu ihrem Vorkommen auf GdA an.

1.6 Thema und Fragestellung

Das immunologische Milieu an der Grenzfläche zwischen Fetus und Mutter folgt in seiner Entwicklung einem geordneten Muster, welches durch seine Regelmäßigkeit gut erforscht werden kann und somit wertvolle Beiträge zum Grundlagenverständnis der Immunologie und Tolerogenese in Säugetieren leistet.

Die Rolle von Glycodelin in der Immunologie der Plazenta ist seit Langem Gegenstand der Forschung. Bisher konnte die modulatorische Wirkung auf spezifische Lymphozyten und unspezifische Makrophagen gut belegt werden. Dendritische Zellen sind als zentrale Generatoren von Toleranz, dem immunologischen Kernproblem der Schwangerschaft, ein ideales Forschungsobjekt. Als Zielzellen der Glycodelinwirkung wurden sie in der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht.

Dabei gingen wir von der **Grundannahme** aus, dass *ex vivo* kultivierte, Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen (moDCs) in ihrem Verhalten menschlichen DCs an der Dezidua ähneln, die überwiegend myeloiden Ursprungs sind (Gardner et al. 2003).

Vor diesem Hintergrund stellten wir die **Arbeitshypothese** auf, dass humanes Glycodelin A aus Amnionflüssigkeit immunmodulatorische Effekte auf humane, Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen *in vitro* ausübt.

Um den Einfluss von Glycodelin auf Dendritische Zellen in der Interaktion mit der adaptiven Immunantwort zu verstehen, wird in der vorliegenden Arbeit das Augenmerk auf folgende DC-Funktionen gelegt:

1. die **Antigenaufnahme und -präsentation** durch die Betrachtung der Endopinozytose und der Expression von MHCII-Molekülen sowie von DC-Sign;
2. die **Kostimulation** in der Expression kostimulatorischer Moleküle;
3. die **lymphoproliferative Kapazität** in der gemischten Lymphozytenkultur und
4. das **Zytokinmuster** in der Messung ausgewählter sezernierter Zytokine im Kulturüberstand.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

FPLC Gradientenpumpe	Pharmacia LKB Biotech (Freiburg)
LCD Liquid Chromatographie System	Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig)
Electrophorese Power Supply Consort E815	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Elektrophoresekammer Mini-Protean 3cell	BioRad Laboratories AG (Reinach)
Photometer Ultrospec™ 3100 pro	Amersham Biosciences GmbH (München)
ELISA-Reader 450mm	MRX Dynatech Lab (Burlington, USA)
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson (BD) (Heidelberg)
Phasenkontrastmikroskop 426126	Carl Zeiss GmbH (Jena)
Lichtmikroskop	Leitz-Wetzlar GmbH (Wetzlar)
PH-Meter GG820	Schott-Geräte GmbH (Hofheim)
Waage PM 460 Delta Range	Mettler-Toledo Garvens GmbH (Giesen)
Omnifuge2.0RS	Heraeus Sepatech (Osterode)
Labofuge 2000	Heraeus-Christ GmbH (Osterode)
Magnetrührer IKA-Combimag RCH	IKA Labortechnik (Staufen)
Vortexer MS1 Minishaker	IKA Labortechnik (Staufen)
GFL-3006 Schüttelapparat	GFL mbH (Burgwedel)
Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf AG (Hamburg)
Präzisionspipetten Reference	Eppendorf AG (Hamburg)
Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Stickstofftank	Linde AG (München)
Laborabzug Uniflow UV 1200 MINI	UniEquip GmbH (Planegg)
Wasserbad Z 323 K	Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen)
Wasserentsalzungsanlage	Millipore (Schwalbach)
Eismaschine ®Scotsman	Enosid GmbH (Herborn)
Thermoblock Dri-Block® DB-2A	Thistle Scientific LTD (Glasgow, England)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Aufreinigung

Dialysierschlauch Visking Typ 36/32	Carl Roth GmbH&Co KG (Karlsruhe)
Trans-Blot-Transfermedium, Nitrocellulosemembran	BioRad AG (Reinach)
Ultrafiltrationseinheit Amicon NMWL 10 kDa	Millipore (Schwalbach)
Filter-Rührzelle MR 3001	Heidolph Instr. GmbH (Schwabach)
202 Vynbakt Injektions-Flachfilter	VYGON GmbH & Co.KG (Aachen)
Halbmikroküvette 10*4mm, Lichtweg 10nm	Sarstedt AG&Co (Nümbrecht)
Chromatographiesäule DEAE ⁴ -Sapharose-CL6B	GE Healthcare (Freiburg)
Chromatographiesäule Octyl Sepharose CL-4B	GE Healthcare (Freiburg)
Chromatographiesäule Resource Phe	GE Healthcare (Freiburg)

Zellkultur

Perfusorspritzen	Sarstedt AG&Co (Nümbrecht)
Einwegspritzen Ciscardt TM 5 ml	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Einmalkanülen 216 STERIKAN	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Kanülen Microlance TM 3, 21G	BD (Heidelberg)
Perfusionsbesteck 19G	Terumo Europe N.V. (Leuven, Belgien)
Kulturflaschen Falcon 175 cm ²	BD (Heidelberg)
6-Well-Platten	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
12-Well-Platten	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
24-Well-Platten	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
96-Well-Rundboden-Platten	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Pipettenspitzen ep T.I.P.S.	Eppendorf AG (Hamburg)
Mikroküvetten, 10*4mm, Lichtweg 10 nm	Sarstedt AG&Co (Nümbrecht)
Objektträger und Deckplättchen	Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen)
BlueMax TM Polypropylene Conical Tubes	Schubert & Weiss GmbH (München)
PCR-Tube	Eppendorf AG (Hamburg)
Probenröhrchen mit Verschlusskappe	BD (Heidelberg)
Probenröhrchen mit Verschlusskappe	Schubert & Weiss GmbH (München)
Kryoröhrchen NALGENE 2 ml	Nalge Nunc Internat. (Roskilde, DK)
Zellschaber	Sarstedt AG&Co (Nümbrecht)

⁴ DEAE= Diethylaminoethan

2.2 Reagenzien

2.2.1 Chemikalien

Acqua dest	Millipore (Schwalbach)
Aqua ad iniectabilia Nr.3143A161	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Ammoniumhydrogencarbonat M79,0,6g/mol	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphatmonohydrat 99g/mol	Merck KgaA (Darmstadt)
Tween 20	BioRad Laboratories Ag (Reinach)
Natronlauge 1mol/l(1N)	Merck KgaA (Darmstadt)
TrizmaBase 99,9% Titration	Sigma Aldrich (Steinlein)
Tween 20	BioRad Laboratories (München)
Trypanblau	Sigma Aldrich (Steinlein)
FITC-Dextran 500 000 Konjugat	Sigma Aldrich (Steinlein)
Milchpulver 500g Blotting Grade	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Brefeldin A	Sigma Aldrich (Steinlein)

2.2.2 Medien, Lösungen, Seren

Phosphat gepufferte physiologische Salzlösung (PBS)	Biochrom AG (Berlin)
RPMI-Medium 1640	Biochrom AG (Berlin)
Penicillin-Streptomycin A2210	Biochrom AG (Berlin)
Humanes AB-Serum E8008	Bio Whittaker, Inc. (Walkersville,USA)
Fetales-Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH (Pasching)
L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin)
Ficoll LG6115	Biochrom AG (Berlin)
Hautdesinfektionslösung Cutasept F	Bode-Chemie GmbH (Hamburg)
Heparin-Natrium, 25.000I.E.	Braun Melsungen Ag (Melsungen)

2.2.3 Reagenziensätze

ABC-Kit	Vector Laboratories (Marion, USA)
Avidin-Alkali Phosphatase Komplexe, AK-5000	Vector Laboratories (Marion, USA)
Chromogen DynaChrome TM DAB	Beckmann Coulter (Krefeld)
Bradford-Reagenz Protein-Assay Farbstoff-Konz.	BioRad Laboratories AG (Reinach)
Protein Assay Standard II	BioRad Laboratories AG (Reinach)
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	BioRad Laboratories AG (Reinach)
BrdU Cell Proliferation ELISA	Roche Diagnostics (Mannheim)
Nitroblau Tetrazolium BCIP / NBT	Sigma Aldrich (Steinlein)
Vecastain Elite ABC-Kit-goat-IgG	Linearis GmbH (Wertheim-Bettingen)

BD OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set	BD (Heidelberg)
BD OptEIA™ Human IL-12 (p40) ELISA Set	BD (Heidelberg)
Fix und Perm-Kit	An der Grub, Bioresearch (Kaumberg)

2.2.4 Zytokine

IL-4	(human, rekombinant)	Pomega (Madison, WL, USA)
GM-CSF	(human, rekombinant)	Immunex (Seattle, WA, USA)
TNF- α	(human, rekombinant)	R&D Systems (Wiesbaden)
IL-1 β	(human, rekombinant)	Strathmann Biotech (Hannover)
Lipopolysaccharide (LPS)		Sigma (Saint Louis, Missouri, USA)

2.2.5 Antikörper

APC Maus-anti-Mensch-CD14 (555399)	BD (Heidelberg)
Cy5 Maus-anti-Mensch-CD86 (555666)	BD (Heidelberg)
PE Maus-anti-Mensch-CD83 (556855)	BD (Heidelberg)
PE Maus-anti-Mensch-DC-Sign (551265)	BD (Heidelberg)
PerCP Maus-anti-Mensch-HLA-DR	BD (Heidelberg)
Polyklonaler Gd-Primärantikörper C-15 sc-12291	Santa Cruz (Heidelberg)
Biotinylierter sekundärer Anti-Ziege-Ak PK-6105	Dynatech Lab (Burlingham, USA)
Anti-CD14-FITC M5E2, Cat # 30544X	BD (Heidelberg)
Anti-TNF-PE MAb11, IgG1, Cat # 18645A	BD (Heidelberg)
Maus IgG1-PE MOPC-21, Cat # 20605A	BD (Heidelberg)

2.3 Aufreinigung von Glycodelin A aus Amnionflüssigkeit

2.3.1 Isolation

GdA wurde aus Fruchtwasser des mittleren Schwangerschaftstrimesters über sequentielle Chromatographie isoliert und im Westernblot identifiziert. Alle Proben stammen von Patientinnen, die sich aus medizinischen Gründen einer Fruchtwasserpunktion unterzogen.

Die Gewinnung und Verarbeitung des menschlichen Materials wurde durch das Ethikkomitee der LMU genehmigt. Alle Patientinnen stimmten der Verwendung zu.

Funktionsprinzip der Chromatographie

Die Chromatographie ist ein Verfahren zur Fraktionierung von Proteinen. Diese werden in einer Flüssigkeit, der mobilen Phase, gelöst und fließen durch eine Säule, welche als stationäre Phase aus einer festen, jedoch durchlässigen Matrix besteht. Beim Durchlaufen der Säule interagieren die geladenen Proteine mit der Matrix, werden adsorbiert und dadurch verlangsamt.

Ein Elutionsmittel wird in steigender Konzentration zugegeben und schwächt die Wechselwirkungen zwischen Protein und Adsorbens, wodurch sich ersteres aus der stationären Phase löst bzw. eluiert wird. Somit werden die Teilchen beim Durchlaufen der Säule entsprechend ihrer biochemischen Eigenschaften unterschiedlich schnell eluiert bzw. durch die Säule unterschiedlich stark gebremst.

Durch die differierenden Laufgeschwindigkeiten können die einzelnen Fraktionen zeitlich separiert und in unterschiedlichen Probenröhrchen aufgefangen werden. Ein photometrischer Schreiber dokumentiert die zeitliche Verteilung der eluierten Fraktionen (siehe Abb.7).

Entsprechend der Interaktionsweise zwischen stationärer und mobiler Phase unterscheidet man dabei die Ionenaustausch-Chromatographie, die Gelfiltrations-, die Affinitäts-Chromatographie und die hydrophobe Chromatographie.

Ein spezielles Verfahren der Chromatographie ist die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC), welche sich durch besonders feine Matrixkügelchen mit einer Umhüllung auszeichnet, die die Art der Auftrennung bestimmt. Durch die größere Interaktionsfläche zwischen Adsorbens, Probe und Elutionsmittel steigt das Auflösungsvermögen. Um geeignete Durchflussraten zu erreichen, muss jedoch ein größerer Druck eingesetzt werden als bei anderen chromatographischen Verfahren. Mit exakter Probenaufladung, einstellbaren Flussraten und einer *Online*-Probendetektion wird die Reproduzierbarkeit und Geschwindigkeit der Fraktionierung optimiert.

Die von uns genutzte *Fast protein liquid chromatography* (FPLC) ist eine der HPLC ähnliche Flüssigkeits-Chromatographie, bei der allerdings Geschwindigkeit und Fluss des Lösungsmittels nicht durch Druck, sondern durch Pumpen kontrolliert werden.

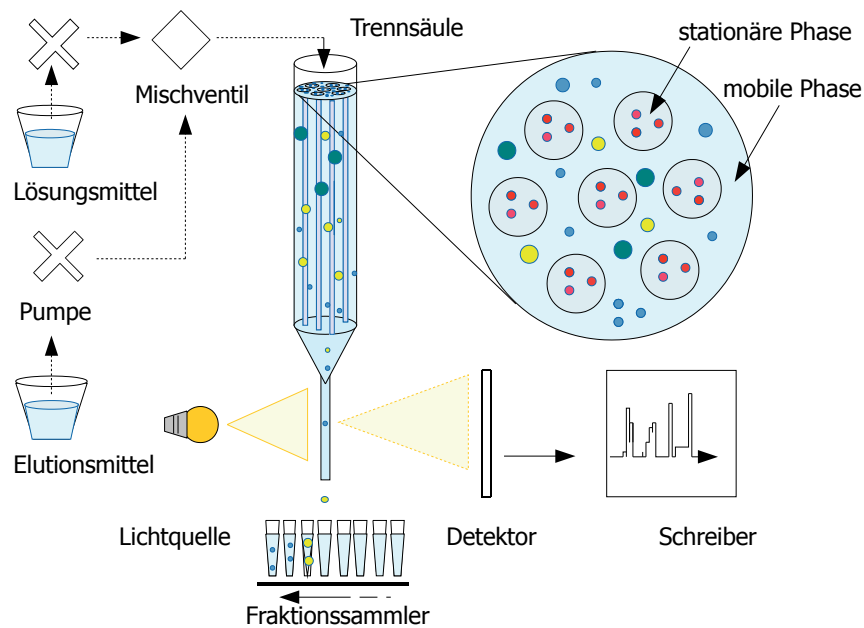


Abb. 7: Chromatographie:

Proteine werden in der mobilen Phase gelöst und fließen durch die stationäre Phase in der Trennsäule. Dabei interagieren sie mit der Matrix und werden adsorbiert. Das Elutionsmittel wird in steigender Konzentration zugegeben, wodurch die Proteine aus der Interaktion mit der festen Phase, der Säulenmatrix, gelöst werden. Entsprechend ihrer biochemischen Eigenschaften werden die Proteine unterschiedlich stark verlangsamt und anhand der diversen Laufgeschwindigkeiten getrennt aufgefangen und über einen Detektor zeitlich erfasst.

Chromatographieschritte

Zu Beginn wurden niedermolekulare Bestandteile des Fruchtwassers ($MG < 14 \text{ kDa}$) durch dreimalige Dialyse gegen destilliertes Wasser über Osmose ausgewaschen. Dieses Vorgehen diente einer groben Voraufreinigung und wurde nach jedem Säulendurchlauf wiederholt.

Nach Filtration durch einen Faltenfilter wurde das Dialysat für die FPLC vorbereitet, indem es zu einer 50 millimolaren (mM) Lösung mit Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3) bei einem pH-Wert (pH) von 8 versetzt wurde. Anschließend wurde das Probenmaterial zur Anionenaustausch-Chromatographie auf eine DEAE-Sepharose-CL-6B-Säule geladen, über einen linearen Gradienten von 50-500 mM NH_4HCO_3 eluiert und mit einer Flussrate von 2 ml/min fraktioniert. DEAE steht für Diethyl-Aminoethan, ein schwach geladenes Anionen-austauscharz.

Die Gd-haltigen Fraktionen wurden nach jeder Chromatographie in der Dot-Blot-Analyse identifiziert (s.u.). Vor der hydrophoben Chromatographie über eine Octyl-Sepharose-CL-4B-Säule wurden die detektierten Proben mit 10 mM Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4) versetzt, dessen Azidität mit Natronlauge auf pH 8 gehoben wurde. Nach Auftragung des Proteingemisches wurde die Säule mit 25% Isopropanol in 10 mM NaH_2PO_4 bei pH 8 gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen Zweikomponentenpuffer aus 40% Isopropanol und 60% 10 mM NaH_2PO_4 bei pH 8.

Der letzte Schritt vollzog sich in einer hydrophoben Interaktions-Chromatographie auf einer Phenylsäule (Resource Phe). Nach einer Voräquilibration bei pH 8 mit 10 mM NaH_2PO_4 und der Probenaufladung erfolgte die Elution über einen linearen Gradienten aus 0-50% Isopropanol in 10 mM NaH_2PO_4 bei einer Flussrate von 2 ml/min.

Zur weiteren Einengung der Gd-haltigen Fraktionen kam eine Rührzelle zur Verwendung, die das Dialysat mit einem Stickstoffdruck von 3-5 bar durch einen Ultrafilter presste, welcher für Moleküle mit einem MG bis zu 10 kDa durchlässig ist. Die übrige Flüssigkeit wurde in der Rührzelle bei einem Volumen von 1 ml aufgenommen und der Filter mit 1 ml einer Lösung aus 10 mM NaH_2PO_4 und 100 mM NaCl bei pH 8 zweimal gewaschen, um einen Proteinverlust durch Membrananhaftung zu vermeiden. Der Austausch der Puffer wurde bei pH 7,4 an einer mit PBS äquilibrierten G25 Säule ausgeführt.

Detektion im Dot-Blot

Im Dot-Blot werden kleine Probenmengen ohne Auftrennung direkt durch kovalente Membranbindungen fixiert und mittels Immunfärbung nach dem Sandwichprinzip detektiert. So können in kurzer Zeit viele Proben hinsichtlich ihrer Positivität für ein Protein geprüft werden.

Zunächst wurden 5 μl aus jeder Chromatographie-Fraktion auf ein Feld der Nitrozellulosemembran getropft und die verbliebenen ungesättigten Proteinbindungsstellen über 1 Stunde (h) mit Milchpulverlösung geblockt. Zur Markierung von GdA wurde ein aus Ziegen gewonnener polyklonaler Primär-Ak gegen die Proteinsequenz C15 des GdA-Moleküls der Lösung über einen Zeitraum von 1,5 h zugesetzt. Zur Detektion dieser immunologischen Markierung diente die ABC-Färbung (siehe Abb.8), welche die starke Affinität zwischen Biotin und Streptavidin nutzt. Ein biotinylierter sekundärer Ak bindet den Ziegen-Ak und zugleich lösliche Streptavidinmoleküle. Streptavidin besitzt seinerseits Bindungsstellen für Biotin. Die Bindungen wurden durch Färbung mit der Peroxidase 3,3'-Diaminbenzidin (DAB) sichtbar gemacht und mit destilliertem Wasser gestoppt.

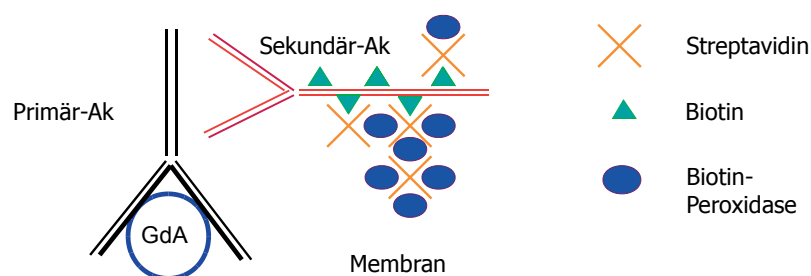


Abb. 8: ABC-Färbung im Dot-Blot:

GdA wird auf der Membran fixiert und durch den Primär-Ak markiert. Diese Markierung wird über einen Sekundär-Ak sichtbar gemacht, der Biotin trägt, welches an Streptavidin bindet. Durch die Peroxidase DAB wird die Bindung gefärbt.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung im Protein Assay nach Bradford

Dieses Verfahren basiert auf der photometrischen Messung eines Farbumschlages nach Zugabe der proteinhaltigen Testlösung zu einem Bradfordreagenz, das anionisches Coomassie-Brillant-Blau enthält. Dieses besteht bei niedrigem pH-Wert überwiegend in seiner kationischen doppelprotonierten roten Form mit maximaler Absorption bei 470 nm und geht sowohl mit kationischen als auch mit unipolaren, hydrophoben Proteinseitenketten eine Komplexbildung ein. Dabei konvertiert der Farbstoff in eine stabile, nicht protonierte, blaue Form, in der er maximal bei 595 nm absorbiert. Bei dieser Wellenlänge wird photometrisch die Extinktion bestimmt. Zur Zuordnung von Proteinkonzentration und Absorption bzw. Extinktion wird mittels Standardproteinen eine Eichkurve für die Kalibrierung erstellt.

In einem ersten Schritt wurde das Bradfordreagenz in einem Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und durch einen Faltenfilter filtriert. Die Proben wurden im Hinblick auf die erwartete Konzentration ebenfalls mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Standardreihe wurde aus einer im Set enthaltenen Standard-Proteinlösung durch Verdünnung mit destilliertem Wasser in den Konzentrationen 1000 µg/ml, 800 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml und 50 µg/ml hergestellt.

Der Probenansatz bestand aus einer Mischung von jeweils 5 ml Bradfordreagenz und 100 µl der entsprechenden Probe bzw. des Standards. Zur Negativkontrolle wurden der Bradfordreagenz lediglich 100 µl destilliertes Wasser zugesetzt. Gemessen wurde bei 595 nm, linearer Regression und einer Integrationszeit von einer Sekunde nach einem Nullwertabgleich zuerst die Standards und im Anschluss sämtliche Proben in einem Zeitraum von maximal 1 h nach dem Ansatz der Proben.

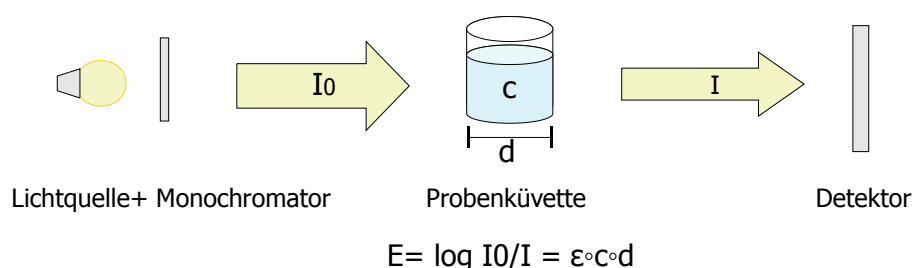


Abb. 9: Photometrie:

Die Abschwächung der Intensität I_0 eines Lichtstrahles durch ein absorbierendes Medium ändert sich exponentiell in Abhängigkeit von der Probenkonzentration c und Schichtdicke d nach der gezeigten Formel. E =Extinktion, ϵ =Extinktionskoeffizient, I =abgeschwächter Lichtstrahl

2.3.3 Identifikation über Westernblot

Bei der Westernblotmethode werden nach Ladung und Größe separierte Proteine aus einem Trenngel auf einen Träger transferiert oder geblottet und dort fixiert. In dieser Form können sie dann einer weiteren Analyse und Identifikation zugeführt werden.

Als Trenngel benutzten wir ein Polyacrylamid-Elektrophorese-Gel. Senkrecht zur Laufrichtung wurde über das Gel ein elektrisches Feld angelegt, welches die Proteinbanden auf eine Trägermembran aus Nitrocellulose oder Polivinylenfluorid (PVDF) zog, wo diese durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert wurden. Das Bandenmuster blieb dadurch erhalten und die Proteine waren für die Bindungen mit dem Detektions-Ak zugänglich.

Elektrophorese

Die Proben wurden in Portionen von 20 μl in Eppendorfgläsern in folgender Weise angesetzt: Das Volumen der GdA-Probe selbst wurde so errechnet, dass sich die Proteinmenge auf 4-10 μg belief. Nach einer 5-minütigen Denaturierung im Thermoblock bei 95°C wurden die Proben 15 min lang im Kühlschrank abgekühlt und kurz zentrifugiert. Als Positivkontrollen verwendeten wir kommerzielle Proteinstandards. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben mit 5 μl Mercaptoethanol versetzt. Das Restvolumen wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Da Proteine Zwitterionen sind, jedoch eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht erzielt werden sollte, mussten die heterogenen Eigenladungen vor der Elektrophorese überdeckt werden. Zu diesem Zweck benutzten wir das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS), welches eine konstant negative Ladung der Proteine bewirkte. Durch dieses Vorgehen konnten die Proteine entsprechend ihrer Länge, ergo ihres Molekulargewichts (MG) aufgetrennt werden.

Als Laufpuffer wurde 100 ml Tris/Glycine/SDS-Puffer zu 900 ml destilliertem Wasser gegeben. Nach diesen Vorbereitungen stellten wir ein Gel und einen Platzhalter in den Kammereinsatz, welcher wiederum in die Elektrophoresekammer eingesetzt wurde. Die innere Kammer wurde komplett mit Laufpuffer gefüllt, die äußere nur 4 cm hoch. Nach Entfernung des Kamms aus dem Gel spülten wir die so entstandenen Wells vorsichtig mit 100 μl Laufpuffer an und befüllten sie anschließend mit dem Proteinstandard (7 μl) bzw. den Proben (20 μl). Die Lauffront wurde bei verschlossener Kammer bei 80 Volt (V) für 30 min und darauf mit 100 V für 90 min laufen gelassen, bis sie das Ende des Gels erreicht hatte.

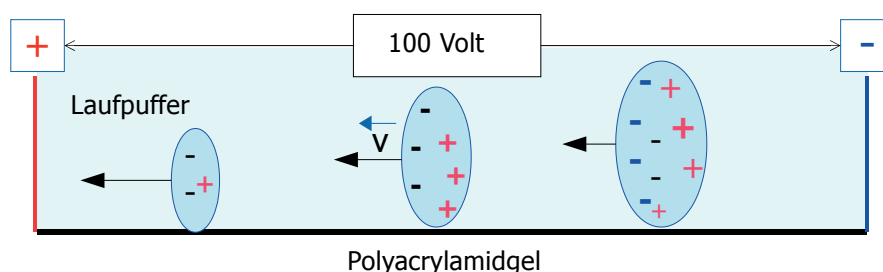


Abb. 10: Prinzip der Elektrophorese:

Proteine (dargestellt als Ellipsen) werden anhand ihrer Ladung und Größe durch ein polyacrylamidhaltiges Trägermaterial in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Kleinere und negativ geladene Teilchen wandern dabei schneller Richtung Anode (rotes Ende, Kennzeichnung mit +). Die Pfeile geben die Laufrichtung und Geschwindigkeit an.

Blotting

Vor der Übertragung der Proteinbanden auf die PVDF-Membran wurde die Membran in Methanol eingeweicht, das Filterpapier und die *Fiberpads* in Blotpuffer. Der Puffer setzte sich aus 100 ml Tris/Glycine-Puffer mit 200 ml Methanol und 700 ml destilliertem Wasser zusammen. Die Klemmkammer wurde mit einem *Fiberpad* und Filterpapier bestückt. Nun konnte das Elektrophorese-Gel aus der Gelkammer blasenfrei auf das Filterpapier umgelegt und mit der PVDF-Membran bedeckt werden, worauf wiederum Filterpapier und *Fiberpad* folgten.

Die Klemmkammer wurde verschlossen, in die innere Blotkammer eingesteckt und mit Blotpuffer gefüllt. Die innere Blotkammer wurde schließlich zusammen mit einem Kühlelement in die äußere Blotkammer eingehängt. Die Laufzeit betrug 90 min bei 100 V.

Färbung

Nach dem Blotting wurde die PVDF-Membran aus der Kammer genommen und für mindestens 2 h mit 5% Milchpulver und 1% Tween in PBS blockiert. Zur Detektion wurde ein immunhistochemisches Sandwich-Verfahren mit einem polyklonalen Gd-Primärantikörper aus der Ziege (sc-12229) und einem sekundären biotinylierten Anti-Ziege-Ak (PK-6105) sowie dem Katalysator Avidin-Alkalin-Phosphatase (AK-5000) angewendet. Als Farbstoff fungierte BCIP/NBT.

Nach Phosphatabspaltung von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-Phosphat (BCIP) wurde durch Reduktion des Nitro-Blau-Tetrazoliums (NBT) zum purpurnen Diformazan ein violetter Farbumschlag sichtbar. Anhand der detektierten Banden für die Proteinstandards und ihres Molekulargewichtes konnte die GdA-haltige Fraktion bei dem erwarteten Gewicht durch die Färbung identifiziert werden.

Für den Einsatz in der Zellkultur wurde das gereinigte Glycodelin durch einen Sterilfilter gepresst, der eine gröbere Kontaminationen verhinderte und schließlich in Aliquots bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.4 Ausschluss einer Endotoxinkontamination

Die Chargen von aufgereinigtem GdA wurden auf Endotoxinkontamination hin getestet, indem die Induzierbarkeit der TNF- α -Expression in mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs) durch Inkubation mit unseren GdA-Proben geprüft wurde.

Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der Zellmembran gramnegativer Bakterien und führen als PAMP zu einer starken externen Immunstimulation (Nijland et al. 2014). Dadurch hätten die Ergebnisse der Experimente, insbesondere in den Ansätzen ohne externe Stimulation, verfälscht werden können.

PBMCs wurden hierfür über 4 Stunden mit LPS (400ng/ml) oder mit Proben, die auf die Verunreinigung mit Endotoxin geprüft werden sollten, sowie mit dem Proteinsekretionshemmer Brefeldin A (20ng/ml) inkubiert.

Danach wurden die Monozyten mit Anti-CD14-FITC markiert, die Zellen fixiert und permeabilisiert. Intrazelluläres TNF wurde während der Permeabilisierung mit Anti-TNF-PE gefärbt (als Kontrolle mit PE-Isotypkontrolle). Der intrazelluläre TNF-Gehalt der CD14-positiven Monozyten wurde durchflusszytometrisch detektiert.

Durch dieses sehr sensitive Screeningverfahren (die untere Nachweisgrenze von Endotoxin lag bei 0,006 ng/ml) konnte eine Endotoxinkontamination ausgeschlossen werden.

2.4 Kultivierung von Dendritischen Zellen und Lymphozyten

2.4.1 Isolation von Monozyten und Kultivierung Dendritischer Zellen

Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen wurden mit Hilfe der Ficoll-Dichtezentrifugation aus venösem Blut freiwilliger, gesunder Spender im Alter von 20 bis 48 Jahren gewonnen.

Dieses Fraktionierungsverfahren geht auf Boyum zurück und basiert auf dem Dichtegradienten zwischen Blut und Ficoll (Boyum 1968). Dabei handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einem spezifischen Gewicht von 1.078 und einer hohen molekularen Masse. Die Erythrozyten und Granulozyten sinken aufgrund ihrer höheren Dichte und einer beschleunigten Agglutination zu Boden, die PBMCs verbleiben als sichtbarer Ring über der Ficollschicht und können abgesaugt werden (siehe Abb.11).

Die Blutproben umfassten pro Spender ein Volumen von 100 ml und wurden nach Heparin-Vorlage (20 I.E.) abgenommen. Darauf wurden sie mit *Phosphate-buffered saline* in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt und in Portionen zu max. 30 ml vorsichtig, unter Vermeidung einer Vermischung der Phasen, über je 15 ml Ficoll geschichtet. Durch eine 20-minütige Zentrifugation mit 1000 g Beschleunigung wurden Monozyten aus peripherem Blut separiert. Um die Zellen von dem zytotoxischen Ficoll zu reinigen, wurden diese dreimal mit PBS gewaschen, also resuspendiert, gepoolt und zentrifugiert. Darauf wurden sie in 20 ml Vollmedium (500 ml RPMI Medium mit 1% Penicilin/Streptomycin, 1% L-Glutamin und 2% AB-Serum versetzt) in Lösung gebracht und in 175 ml Kulturflaschen im Brutschrank für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

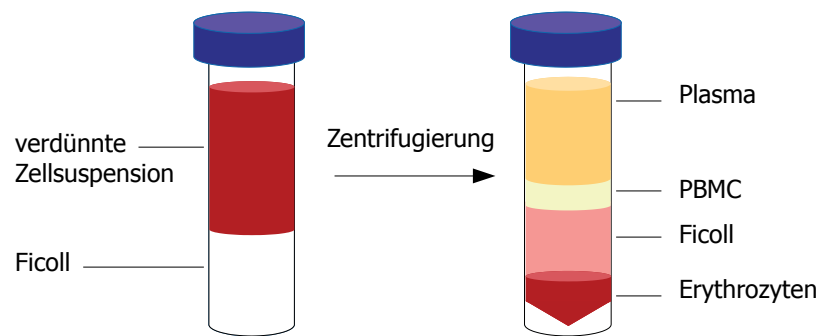


Abb. 11: Ficoll-Dichtezentrifugation:

Das Prinzip der Fraktionierung beruht auf dem Dichtegradienten zwischen Blut und der polymeren Zuckerlösung. Die kleineren Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte, die größeren PBMCs bleiben als sichtbarer Ring über der Ficollschicht.

PBMCs umfassen Lymphozyten, DCs, Makrophagen und Monozyten. Letztere konnten durch ihre Adhärenz an negativ geladenen Oberflächen isoliert werden. Nach 1 h Inkubation adhärierte der Großteil der Monozyten am Flaschenboden, die Lymphozyten hingegen schwammen überwiegend frei im Medium.

Weitere Lymphozyten wurden durch Beklopfen des Kulturflaschenbodens sowie eine dreifache Spülung mit PBS in Suspension gebracht und mit dem Medium abgesaugt. Dadurch konnte die Reinheit der verbleibenden adhärenen Monozyten erhöht werden.

Diese wurden über Nacht in 20 ml Vollmedium kultiviert, nach 12-24 h mithilfe eines Zellschabers und PBS-Spülungen wieder in Suspension gebracht und geerntet. Die Monozyten wurden mit 300 g Beschleunigung bei 4°C abzentrifugiert, dekantiert und nach mikroskopischer Zellzählung zu je 1 Millionen Zellen/ml im Vollmedium resuspendiert.

Daraufhin wurden die Zellen ohne Medienwechsel mit GM-CSF (1000 U/ml Medium) und IL-4 (500 U/ml Medium) in 2 ml pro Well über sechs Tage nach bekanntem Standardverfahren inkubiert (Bender et al. 1996; Romani et al. 1994). Danach waren die Monozyten zu DCs ausgereift und konnten in unseren Versuchen eingesetzt werden.

2.4.2 Reifeinduktion und Koinkubation Dendritischer Zellen mit Glycodelin A

Am 7. Tag nach der Blutabnahme wurden die Versuche angesetzt. Die DCs wurden hierzu unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert, mit Hilfe von Zellschabern geerntet, gezählt, gewaschen und in 24-Well-Platten zu jeweils 1 Millionen Zellen und 1 ml Vollmedium pro Well verteilt. Im Folgenden wurde mit den einzelnen Wells entsprechend des geplanten Versuches verfahren. In einem Well wurden die Zellen als Negativkontrolle unbehandelt belassen, in einem anderen als Positivkontrolle mit der Standardkombination der Reifeinduktoren TNF- α (1000 U/ml) und IL-1 β (10 ng/ml) versetzt (Macagno et al. 2007).

Auf diese Weise standen ausgereifte DCs zur Verfügung. Zu den Proben wurden je nach Ansatz GdA in Reihen zu 10 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg und 100 µg gegeben und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden pro Well 200-400 µl des Kulturüberstandes abgenommen und für die Zytokinbestimmung bei -20°C gelagert. Je nach Versuchsaufbau folgte nach 24 h eine Kokultivation mit Reifeinduktoren. Vor ihrer weiteren Verwendung und nach einer erneuten Abnahme des Kulturüberstandes wurden die Zellen mehrfach gewaschen.

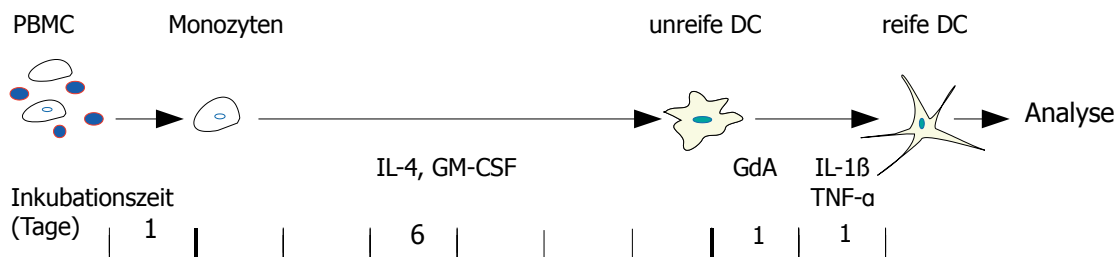


Abb. 12: Generierung Dendritischer Zellen:

Monozyten wurden aus mononukleären Zellen des Spenderblutes durch Adhäsion isoliert. Nach 6-tägiger Inkubation mit IL-4 und GM-CSF differenzierten die Monozyten zu unstimulierten DCs. Nach weiteren 48 h, in welchen die DCs entsprechend den diversen Ansätzen mit Reifestimuli und Glycodelin behandelt wurden, standen ausgereifte Zellen zur Verfügung. Diese wurden vor ihrem weiteren Einsatz mit frischem Medium gewaschen, wie für Monozyten unter 2.4.1 beschrieben.

2.4.3 Lymphozytenanreicherung

Lymphozyten wurden bei der Isolation von Monozyten als nicht-adhärenenten PBMCs im Überstand geerntet und nach durchflusszytometrischer Identifikation im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (siehe Kapitel 1.5.2) weiterverwendet.

2.5 Analyseverfahren

2.5.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die optische Kontrolle der Zellkulturen bediente sich der Phasenkontrastmikroskopie, welche Unterschiede in der optischen Dichte durch eine spezielle Blendenoptik als Helligkeitsunterschiede darstellt. Dies ist insbesondere bei der Betrachtung ungefärbter Zellen von Vorteil.

Das Verfahren beruht auf dem Phänomen der Phasenverschiebung, welches auftritt, wenn Licht ein Medium, z.B. Zellen, durchdringt, das in seinem Lichtbrechungsindex von demjenigen der Umgebung abweicht. Dadurch wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes verändert. Die Kontrastbildung entsteht durch den Phasenunterschied zu den Lichtwellen der Umgebung, welcher – entsprechend der Brechungsindizes der Objekte – annähernd proportional zu deren

Dichte ist. Dieser Unterschied wird durch eine Ringblende im Objektiv sowie eine Ringaperturblende im Kondensor des Mikroskops in Helligkeitsstufen übersetzt. Dadurch entspricht die Helligkeitsverteilung in dem wiedergegebenen Bild in etwa der Dichteverteilung des untersuchten Probenmaterials.

Färbung mit Trypanblau

Mit Vitalitätstests bestimmt man nach traumatischen Prozeduren den Anteil lebendiger Zellen, indem man die Veränderung der Membranpermeabilität nach dem Zelltod nutzt. Durch diese wird das Eindringen bestimmter Farbstoffe ins Zellinnere möglich, welche eine intakte Zellmembran nicht passieren könnten. So nehmen z.B. vitale Zellen den sauren Farbstoff Trypanblau nicht auf, wohingegen sich das Zytoplasma abgestorbener Zellen nach kürzester Zeit blau färbt.

Hierzu wurden die Proben vor dem Mikroskopieren mit Trypanblau (in 0,1%-iger Konzentration) in einem Mischungsverhältnis des Farbstoffes zur Probe von 1:10 versetzt. Nach einminütiger Inkubation wurde die Gesamtzellzahl, sowie die Fraktion lebender und toter Zellen in der Neubauer-Kammer ausgezählt. Der Prozentsatz ungefärbter Zellen entsprach dem Anteil vitaler Zellen. Die Neubauer-Zählkammer ist ein Hilfsmittel zur Berechnung sehr kleiner Volumina.

Dadurch konnte die in wenigen μl Zellsuspension mikroskopisch ausgezählte Zellzahl auf die in unseren Versuchen eingesetzten Volumina in der Größenordnung von ml übertragen werden.

2.5.2 Durchflusszytometrische Analyse ausgewählter Oberflächenmarker

Funktionsprinzip

In der Durchflusszytometrie können verschiedene Eigenschaften von Zellen oder anderen Teilchen analysiert werden, welche während des Messvorgangs einzeln hintereinander in einem Messkanal durch einen fokussierten Laserstrahl gesogen werden oder fließen – daher der Name Durchflusszytometrie oder FACS (*Fluorescence activated cell scanning*).

Gemessen wird dabei die Lichtstreuung, welche entsteht, wenn die Messpartikel oder Zellen den Laserstrahl (Argonlaser mit Wellenlängen von 488 nm und 635 nm) im 90°-Winkel kreuzen. Das Streulicht wird von zwei Linsen gebündelt, welche in Verlaufsrichtung (Vorwärtsstreulicht) und im rechten Winkel (Seitwärtsstreulicht) zum Strahl ausgerichtet sind. Dabei wird das Vorwärtsstreulicht neben der Zellform vor allem durch die Größe der Zelle bestimmt. Kleine Zellen verursachen weniger Streulicht als große. Das Seitwärtsstreulicht entsteht im Wesentlichen infolge komplexer Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Binnenstrukturen, also grob betrachtet durch die Granularität entsprechend der Lysosomendichte. Die Zielpopulation kann mithilfe dieser morphologischen Parameter ausgesucht (*gated*) und weiter analysiert werden.

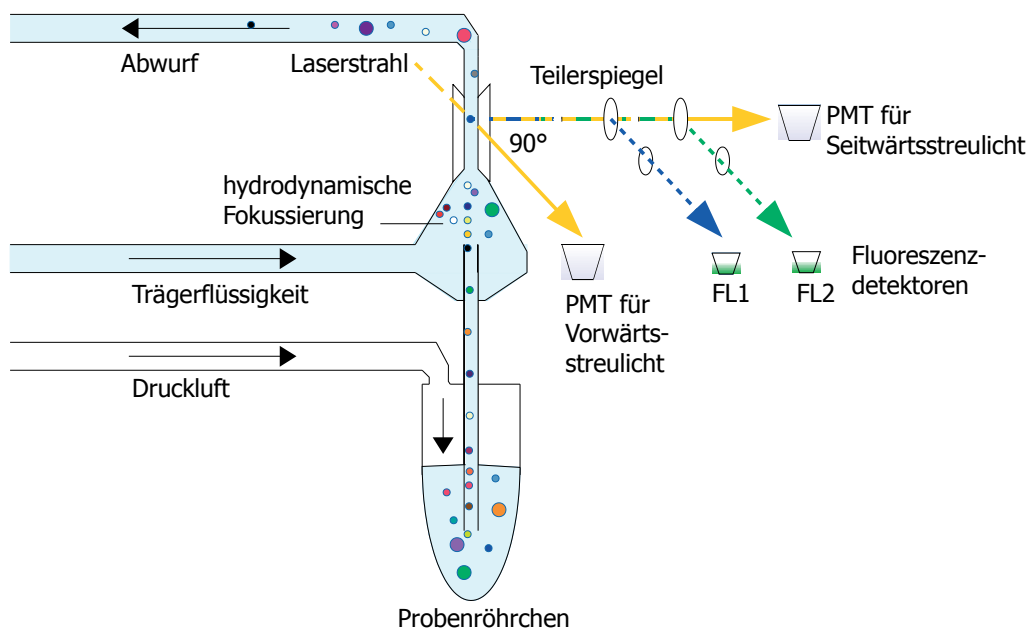


Abb. 13: Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie:

Fluoreszenzgefärbte Zellen werden aus dem Probenröhrchen in den Probenstrom gesogen und durch die zugeleitete Trägerflüssigkeit hydrodynamisch fokussiert. Im Messkanal durchfließen sie einzeln hintereinander den Laserstrahl. Das Streulicht wird von zwei Linsen im 90° Winkel gebündelt und mithilfe hochsensitiver Photomultiplier (PMT) aufgezeichnet.

Auch die Fluoreszenzsignale werden nach ihrer Passage durch einen Bandpassfilter detektiert, welcher nur die Wellenlänge eines Fluorochroms durchlässt.

Zu diesem Zweck werden die gewünschten Oberflächenstrukturen vor der Messung mit Ak markiert, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff einer definierten Wellenlänge konjugiert sind (siehe Abb.14).

Dieses Chromophor wird durch den Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gehoben und zur Emission von Lichtquanten angeregt, die ebenfalls durch eine Linse fokussiert werden. Nachgeschaltete Filter sortieren das gebündelte Licht nach Wellenlängen und führen es hochsensitiven Photomultipliern zu. Die optischen Signale werden durch einen Computer ausgewertet und graphisch aufgearbeitet. Durch diese Mehrfarbenanalyse können verschiedene Fluoreszenzsignale simultan detektiert und quantitativ analysiert werden.

Die Fluoreszenzintensität bildet die Anzahl der gebundenen Ak ab und ist somit proportional zur Anzahl der Ak-markierten Zielstrukturen. Die Intensität der emittierten Lichtimpulse in einem definierten Frequenzbereich wird in einem Histogramm gegen die Anzahl der Zellen mit dieser Fluoreszenzintensität aufgetragen.

Die Korrelation zweier Parameter wird in einem Punktwolkenhistogramm mit beliebiger Achsendefinition durch Streulicht- und Fluoreszenzparameter abgebildet (siehe Abb.25).

Klassifikation der *Cluster of Differentiation*

Leukozyten tragen an ihrer Oberfläche Glykoproteine, die für bestimmte Zellen und ihre Reif Zustände spezifisch exprimiert werden und ein weites Spektrum an Funktionen innehaben, von der Rezeptorfunktion und Adhäsionseigenschaften bis zur interzellulären Kommunikation.

Seit 1981 werden monoklonale Ak, welche mit dem gleichen Oberflächenmolekül interagieren, als Reagenzgruppe, den sogenannten *Cluster of Differentiation* (CD), zusammengefasst und mit einer Ziffer versehen, welche das spezielle Oberflächenmolekül kennzeichnet.

Da das Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle stark vom Zelltyp und dem Funktionszustand der Zelle abhängt, lässt sich mit Hilfe der Immunhistochemie und Durchflusszytometrie über diese Differenzierungscluster detektieren, zu welcher Leukozytenklasse eine Zelle gehört und unterscheiden, in welchem Reife- bzw. Aktivierungszustand sie sich befindet.

In unseren Versuchen wurde zytometrisch die Expression ausgewählter CD-Moleküle auf Makrophagen und moDCs unter definierten Inkubationsbedingungen untersucht.

Fluoreszenzen

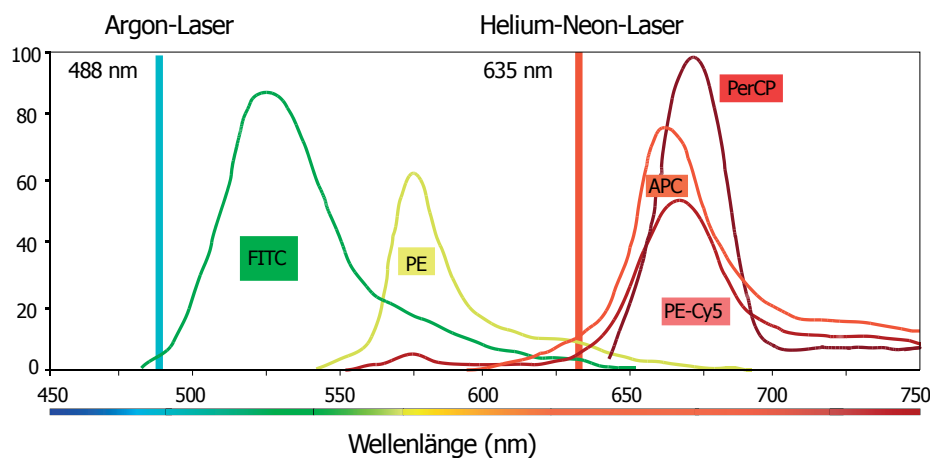


Abb. 14: Fluoreszenzspektrum (modifiziert nach www.bdbiosciences.com):

An der Abszisse ist die Wellenlänge der Lichtemissionen aufgetragen, an der Ordinate die Fluoreszenzintensität.

Fluorescein Isothiocyanat (FITC):

Absorptionsmaximum 494 nm; Emissionsmaximum 520 nm: Messung im Kanal 1 (FL1).

FITC ist relativ schwach fluoreszent und sollte daher nur für hochexprimierte Marker eingesetzt werden. Wir verwendeten es im Endozytose-Versuch mit Dextran.

Pigment R-phycoerythrin (PE):

Absorptionsmaximum 496 nm; Emissionsmaximum 578 nm: Messung im Kanal FL2.

PE ist ein photosynthetisches Pigment und kann aus Rotalgen gewonnen werden.

Mit 23 Phycoerythrobilin-Chromophoren pro Molekül ist es das hellste Fluorochrom in der Durchflusszytometrie.

Allophycocyanin (APC):

Absorptionsmaximum 650 nm; Emissionsmaximum 660 nm: Messung im Kanal FL4.

APC stammt aus Blaualgen (siehe Abb.16). Mit 6 Phycocyanobilin-Chromophoren pro Molekül ist es sehr hell. Zur Anregung ist ein Laser im Wellenlängenbereich von 635 nm notwendig, z.B. Helium-Neon-Laser.

Tandem-Konjugat Phycoerythrin-Cyanid (PE-CyTM5):

Absorptionsmaximum 496 nm; Emissionsmaximum 667 nm: Messung im Kanal FL4.

Das Tandem-Konjugat verbindet den Cyanidfarbstoff mit Phycoerythrin: Wegen der breiten Absorptionsraten und gleicher Emissionsraten sollte es nicht mit APC simultan verwendet werden.

Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP):

Absorptionsmaximum 482 nm; Emissionsmaximum 678 nm: Messung im Kanal FL3.

PerCP ist Teil des Photosyntheseapparates des Dinoflagellaten Glenodinium (siehe Abb.15).

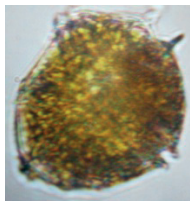


Abb. 15:
Dinoflagellat
PerCP-Quelle

Photo 2001
Brunnhuber

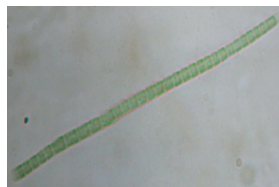


Abb. 16:
Blaualgen
APC-Quelle

Photo 2001
Brunnhuber

Analyse ausgewählter Oberflächenmarker

Zur Analyse wurden 20.000 Zellen in Polyesterol-Teströhrchen abzentrifugiert und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe bis auf ein Volumen von etwa 100 µl abgenommen. Darauf resuspendierten wir die Zellen im verbliebenen PBS. Zur spezifischen Färbung erfolgte die Inkubation für 20 min unter Lichtausschluss auf Eis mit jeweils 10 µl/100µl der fluoreszenzgefärbten Maus-anti-Mensch-Ak. Im Anschluss daran wurden die Zellen dreimal mit PBS und 3% FCS gereinigt und so die ungebundenen Ak entfernt. Für die Färbung verwendeten wir FITC-, PE-, CyChromeTM-, PerCPTM- oder APC-gekoppelte Ak (direkte Fluoreszenz) bzw. unmarkierte Ak, sogenannte Isotypen (indirekte Fluoreszenz). Die Messung der Fluoreszenzeigenschaften wurde an dem Durchflusszytometer „FACScalibur“ vorgenommen und die Daten mit CellQuestTM ausgewertet. Die Hintergrundstrahlung konnte für durch eine ungefärbte Zellprobe als Negativkontrolle ermittelt werden und bei Mehrfachfärbung einer Probe durch die Fluoreszenz der für den jeweiligen Ak negativen Fraktion.

2.5.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Endozytoseaktivität

Die Endozytosefähigkeit der DCs wurde durch die Aufnahme von fluoreszenz-markierten Kohlenhydraten in Form von FITC-markiertem Dextran mit einem MG von 40 kDa gemessen.

Dabei ist als Ag-Aufnahme die totale zellassozierte, oberflächengebundene und internalisierte Fluoreszenz zu verstehen.

Die Zellen wurden in Portionen zu je 100.000 in zwei parallelen Ansätzen jeweils für 2 h in Kulturmedium mit 10 µl Dextran inkubiert: die Testkultur bei 37°C im Brutschrank, die Negativkontrolle bei 0°C. Die Inkubation auf Eis ermöglichte die Unterbindung einer aktiven Endozytose. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte, unreife, bei 37°C inkubierte DCs.

Getestet wurden ausgereifte Zellen mit und ohne GdA-Präinkubation und Zellen ohne Reifeinduktion mit solitärer GdA-Behandlung (25 µg/ml). Das nicht aufgenommene, freie Dextran wuschen wir nach 2 h Inkubation dreimal in PBS mittels Zentrifugation bei 400 g Beschleunigung über je 7 min aus und analysierten die fertigen Proben unmittelbar darauf bezüglich ihrer inkorporierten Fluoreszenzintensität.

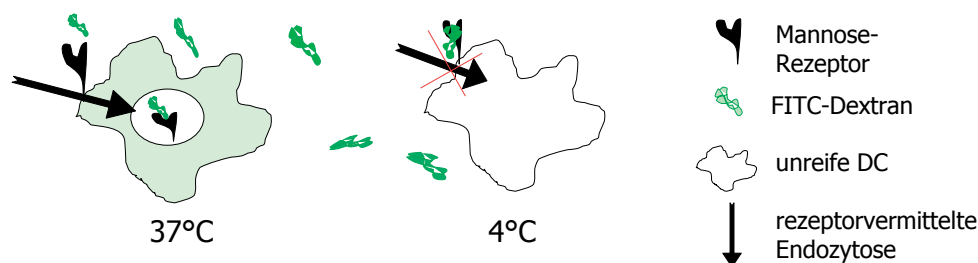


Abb. 17: Endozytose im FITC-Dextran-Versuch:

Bei 37°C wird das mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markierte Kohlenhydrat von der DC aufgenommen. Bei 4°C ist die Endozytose hingegen blockiert.

2.5.4 Proliferationsbestimmung mit 5`-Bromo- 2`-deoxy-Uridin

Zur Bestimmung der lymphoproliferativen Aktivität der vorinkubierten moDCs wurde in 96-Well-Platten eine Kokultur mit allogenen, nicht adhärenenten PBMCs angelegt – im Sinne einer gemischten Lymphozytenkultur oder *mixed lymphocyte reaction* (MLR) – und zwar jeweils in dreifacher Ausführung in den Verhältnissen von moDCs zu Lymphozyten von 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 bei einer konstanten Lymphozytenkonzentration von $2 \times 10^5/200 \mu\text{l}$.

Um die im Rahmen der DC-Stimulation eingesetzten Immunmodulatoren TNF- α und IL-1 β , sowie Glycodelin A zu entfernen, wurden die geernteten DCs nach Abnahme des Überstandes für die Zytokinbestimmung dreimal mit frischem Medium gewaschen, wie unter 2.4.1 beschrieben.

Nach 48 h wurde das synthetische Nukleosid 5`-Bromo-2`-deoxy-Uridin (BrdU), ein Thymin-Analogon, als Marker zu 10 µl und 10 µM dem Kulturmedium zugesetzt und den PBMCs für den Einbau in die DNS anstelle der Base Thymin angeboten. Dieser Einbau ist proportional zur DNS-Neusynthese und damit ein geeigneter Marker der Zellproliferation.

Quantitativ wurde der Einbau in einem *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) erfasst. Darunter versteht man ein immunologisches Nachweisverfahren, bei dem ein spezifischer Ak (der *Capture-Ak*) gegen das zu testende Ag an eine Trägersubstanz wie z.B. eine 96-Well-Platte gebunden ist. Durch Inkubation mit der Probe bilden sich Immunkomplexe, an welche in einem zweiten Schritt ein enzymmarkierter Ak bindet. Dieser erzeugt nach Zugabe eines chromogenen Substrats einen Farbumschlag, der im Photometer quantifiziert werden kann.

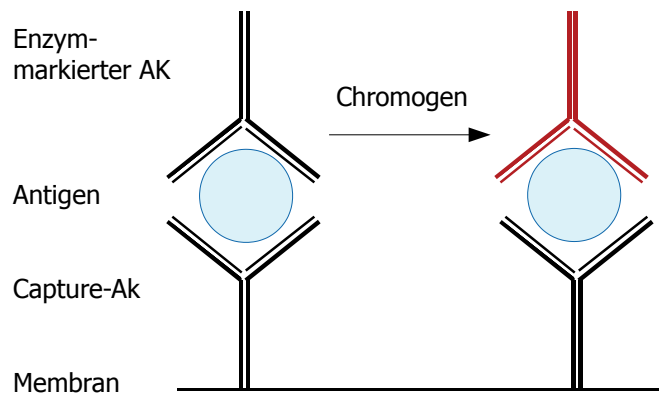


Abb. 18: Antikörpergebundenes enzymatisches Immunadsorptionsverfahren (ELISA):

Ein membrangebundener *Capture-Ak* fängt das Messsubstrat (Ag) ein. An den Immunkomplex bindet ein enzymmarkierter Sekundär-Ak, welcher nach Zusatz eines Chromogens eine Reaktion mit resultierendem Farbumschlag katalysiert, der photometrisch quantifiziert wird.

Nach 6-12 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen 10 min bei 1200 U/min in den Wellplatten abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das abzentrifugierte Probenmaterial bei 60°C über 1 h hitzefixiert. Durch Zugabe von 200 µl FixDenat pro Well für 30 min bei Raumtemperatur (RT) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die DNS denaturiert. Zur Immundetektion der nun freigelegten, BRDU-gelabelten DNS wurde ein Peroxidase-markierter spezifischer Anti-BRDU-Ak verwendet. Nach 90 min wurde der Ak dreimal mit Waschpufferlösung gewaschen und nach Entfernung des Waschpuffers für 15-30 min in 100 µl/Well Substratlösung bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Substratlösung besteht aus 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin und wurde durch die Peroxidase des Anti-BRDU-Aks in einer Enzym-Substrat-Reaktion zu einem blaugefärbten Reaktionsprodukt umgesetzt. Bei sichtbarem Farbumschlag ins Blaue wurde die Reaktion mit einmolarem H₂SO₄ gestoppt und ein erneuter Farbumschlag ins Gelbe hervorgerufen. Die photometrische Extinktion wurde bei 450 nm und 690 nm Referenzwellenlänge im Lumineszenz-ELISA-Reader gemessen. Die unspezifische Bindung von BRDU und Anti-BRDU-Ak an das leere Well ohne Zellen ergab den Leerwert, die Bindung von Anti-BRDU-Ak an unmarkierte Zellen die Systemkontrolle bzgl. der Spezifität.

2.5.5 Messung der Zytokinsekretion im Immun Assay

Um zu messen, wie sich die Produktion ausgewählter Zytokine durch reife moDCs nach der Inkubation mit Gd veränderte, wurde am 9. Tag nach der Blutabnahme und 48 h nach der Stimulation der Überstand in den Wells abpipettiert und bei -20°C eingefroren.

Für den ELISA bestückten wir 96-Well-Platten je Well mit 100 µl Capture-Ak und inkubierten sie bei 4°C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten, nach Aspiration der enthaltenen Flüssigkeit, dreimal mit 300 µl Waschpuffer pro Well gespült und im Anschluss umgekehrt auf saugfähiges Papier gestülpt, um Überreste des Waschpuffers durch Absorption zu entfernen.

Im nächsten Schritt blockierten wir die Platten mit je 200 µl *Assay Diluent* und inkubierten sie erneut für 1 h bei RT. Nach Spülung mit Waschpuffer, wie oben beschrieben, wurden schließlich 100 µl Standard bzw. Probe zu den Wells gegeben und diese über 2 h bei RT inkubiert.

Eine weitere Spülung mit Waschpuffer erforderte nun fünf Waschgänge bevor je 100 µl *Working Detektor* zugegeben werden konnten. Der *Working Detektor* besteht aus dem Detektions-Ak und einem *Enzyme Reagent Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*.

Nach weiteren sieben Waschgängen erfolgte die Aufpipettierung von je 100 µl Substratlösung und nach 1 h Inkubation bei RT und im Dunkeln wurde die Reaktion mit je 50 µl Stopplösung gestoppt. Hiernach maß der ELISA-Reader innerhalb von 30 min die Wells bezüglich ihrer photometrischen Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Für die Kalibrierung der Standards verwendeten wir humanes rekombinantes IL-10 und IL-12 (p40) von BD, aus welchen durch Verdünnung mit *Assay Diluent* entsprechende Standardreihen erstellt wurden. Das *Assay Diluent* wurde aus PBS mit 10% FCS bei pH 7 hergestellt bzw. direkt bei BD bezogen. Als Waschpuffer setzten wir PBS mit 0,05% Tween-20 ein, als *Coating-Puffer* 0,1 M NaCarbonat bei einem pH-Wert von 9,5 und als Stopplösung einmolare Phosphorsäure (H₃PO₄). Die Substratlösung aus Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid wurde von BD geliefert.

2.6 Statistik

Die Daten werden als Median mit dem Standardfehler des Medians dargestellt. Im Versuch zur Endozytotischen Aktivität (Kap. 3.3) wird das arithmetische Mittel über den Mean Fluorescence Index mit dem Standardfehler des Means dargestellt.

Die statistische Signifikanz wurde durch den T-Test für gepaarte Stichproben von Originalwerten ermittelt. Differenzen waren bei $P < 0,05$ statistisch signifikant. Als Software wurde das "*Statistical Package for the Social Sciences 15.0*" (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Aufreinigung von Glycodelin A aus Fruchtwasser

3.1.1 Fraktionierung in der Chromatographie

Isolation von GdA aus Amnionflüssigkeit mittels sequentieller Chromatographie. Die Grafik zeigt das Elutionsprofil einer Gd-haltigen Octyl-Sepharose-Fraktion (Probenvolumen 1 ml) an einer Resource Phenyl Säule. Die eluierten Proteinfractionen sind in Relation zur Laufzeit aufgetragen. Ihre Konzentration wird aus der integrierten Fläche unter einem Einzelausschlag (Peak) berechnet.

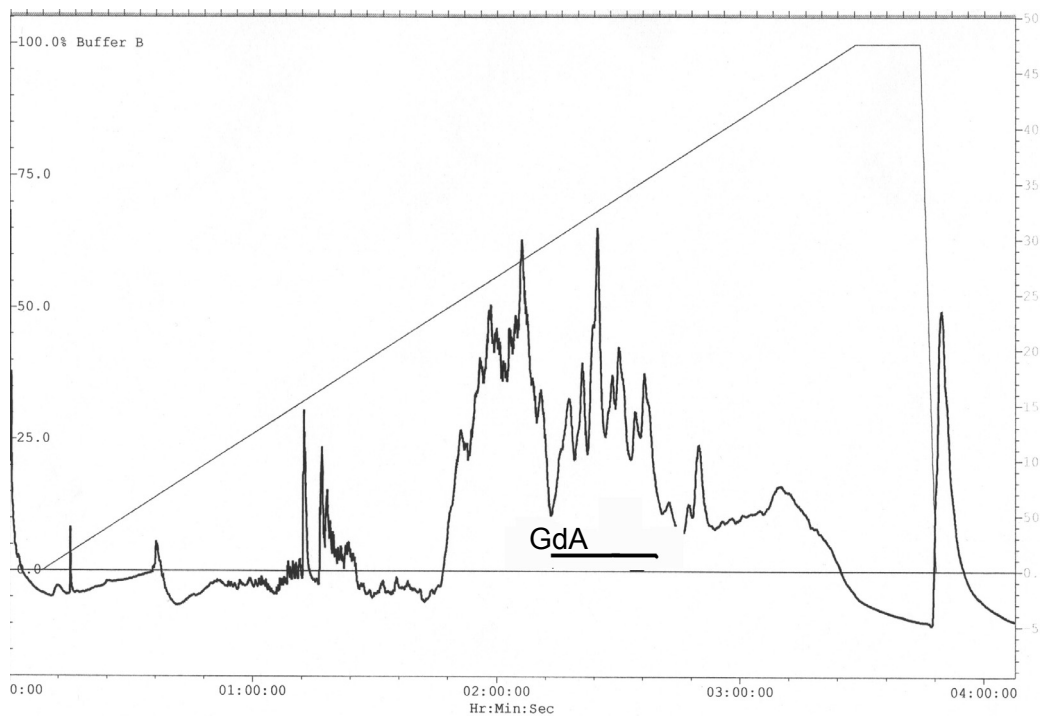


Abb. 19: Chromatogramm der hydrophoben Interaktions-Chromatographie an Resource Phe:

Die Elution erfolgte durch einen linearen Konzentrationsgradienten von 0-50% Isopropanol in 10 mmol/l Natriumphosphat (Buffer B), welcher an der linken Ordinate aufgetragen ist und mit einer Flussrate von 2 ml/min zugeben wurde. Die an der im Bild rechten Ordinate dargestellte Skala dient der Quantifizierung der einzelnen Ausschläge. Die Abszisse gibt die Zeit (h:min:sek) mit Elutionsbeginn um 0:00 an. Die Gd-haltige Fraktion ist in der Grafik durch die Beschriftung "GdA" und den Balken markiert und wurde isoliert.

3.1.2 Detektion im Dot-Blot

Abgebildet sind zwei Nitrozellulosemembranen, auf denen die Bindung zwischen einem polyklonalen Ziege-anti-Mensch-Ak und Glycodelin über einen sekundären Antikörper nach dem ABC-Schema sichtbar gemacht wurde. Die Gd-Proben wurden punktförmig (Dot) auf einen Filter (Blot) aufgetragen.

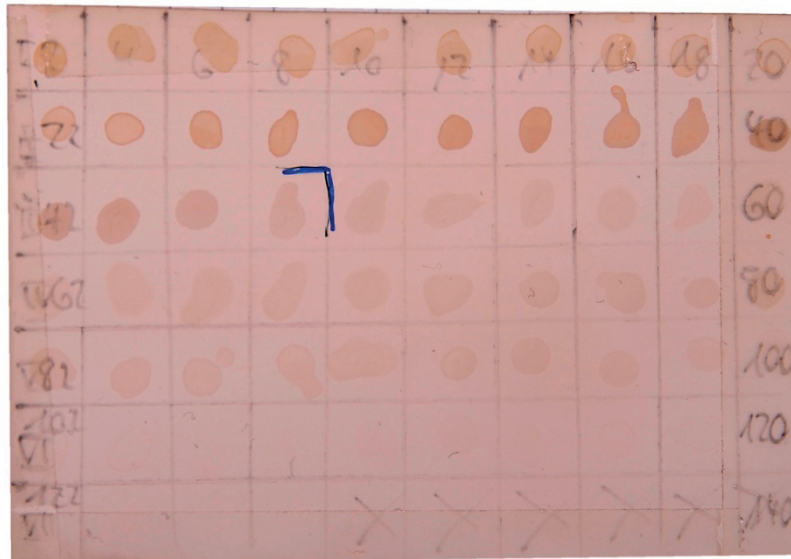


Abb. 20: Dot-Blot nach der 1.Chromatographie an einer DEAE-Sephrose-CL-6B-Säule:

Die einzelnen Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie sind mit Bleistift auf der Membran nummeriert. Die Portionen Nummer 1-48 wurden zur weiteren Aufreinigung einer zweiten Chromatographie zugeführt.

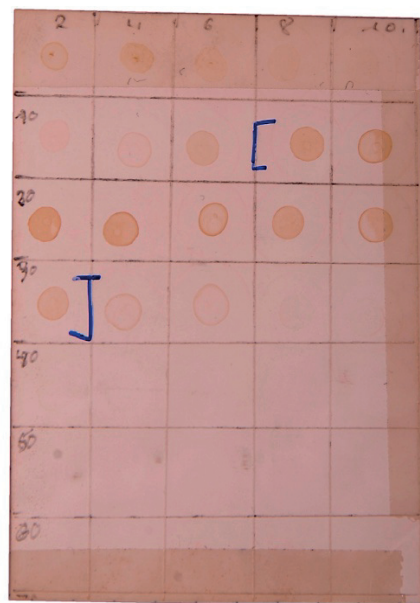


Abb. 21: Dot-Blot nach der 2.Chromatographie mit Octyl-Sephrose-Cl-4B-Säule:

Durch die hydrophobe Chromatographie konnte die Anzahl der Glycodelin-haltigen Fraktionen auf Nummer 18-32 weiter eingengt werden.

3.1.3 Identifikation im Westernblot

Die Abbildung zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel mit aufgereinigtem Glycodelin A. GdA wurde mit 2-Mercaptoethanol denaturiert und mit polyklonalem Ak markiert. Ein biotinylierter Sekundär-Ak wurde mit einem Phosphatase-Komplex gekoppelt und so die Gd-Bande durch Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium violett gefärbt.



Abb. 22: Identifikation im Westernblot:

Im linken Bereich des Gels sind Molekulargewichtsmarker (MGM) aufgetragen, deren MG linksbündig in Kilodalton aufgetragen ist.

Rechts in der SDS-Page präsentiert sich Glycodelin A, wie erwartet, in einer Bande zwischen den Markierungen für 26 und 34 kDa, ca. bei 28 bis 29 kDa.

3.1.4 Quantifizierung in der Bradford-Proteinbestimmung

Die aufgereinigten Glycodelin-Chargen wurden in der Bradford-Bestimmung anhand ihres Proteingehaltes quantifiziert.

Durch unser Aufreinigungsverfahren wurde durchschnittlich aus einem Volumen von 1,1 l Fruchtwasser Glycodelin A in einer Quantität von 1,9 mg bei einer maximalen Konzentration von 1,3 mg/ml angereichert.

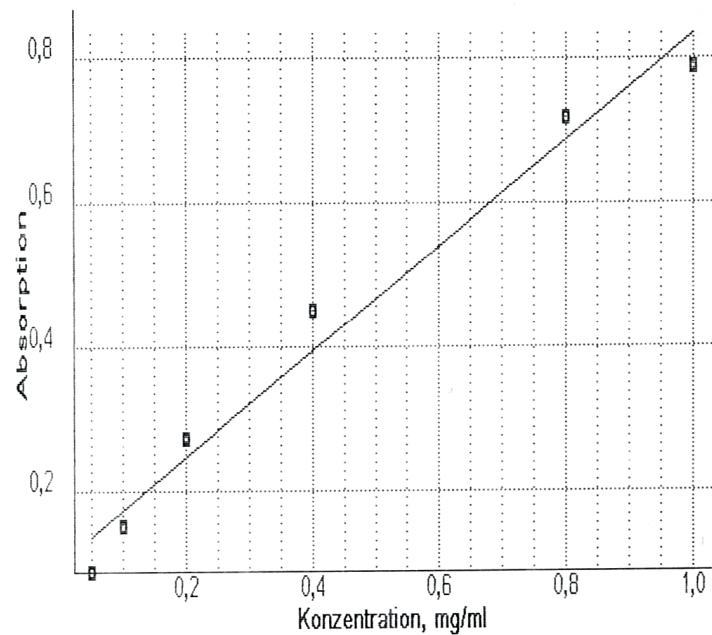


Abb. 23: Standardkurve der Bradford-Proteinbestimmung:

In der Standardkurve ist die Lichtabsorption (Ordinate; 1 = 100% Absorption) in Relation zur Konzentration der Proteinstandards (Abszisse, Einheit mg/ml) aufgetragen.

Die photometrische Messung wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm über eine Integrationszeit von 1 Sekunde vorgenommen. Die ermittelte Kurve weist bei einer Steigung von 0,735 eine 97,7% Linearität (r^2) auf und diente der Ermittlung der entsprechenden Konzentration im GdA-Proben.

3.1.5 Prüfung der Glycodelin-Chargen auf bakterielle Kontamination

Die Prüfung einer möglichen Endotoxin-Kontamination mit Lipopolysacchariden (LPS) erbrachte stets negative Ergebnisse. Durch die Inkubation von PBMCs mit unseren Glycodelin-Proben konnte nie eine Sekretion von TNF- α induziert werden. Eine bakterielle Kontamination wurde somit praktisch ausgeschlossen.

3.2 Morphologische Charakterisierung Dendritischer Zellen

3.2.1 Morphologie im Phasenkontrastmikroskop

Im Phasenkontrastmikroskop wurden die Kulturen vor allem im Hinblick auf eine mögliche Pilzkontamination oder Verunreinigung kontrolliert. Daneben diente die Methode der Zellzählung in der Zählkammer und der Vitalitätsprüfung mit Trypanblau.

In allen Versuchen wurden Vitalitätstests mit Trypanblau durchgeführt, wobei bei höheren GdA-Konzentrationen über 50 µg/ml die Zytotoxizität anstieg (Daten nicht gezeigt).

Am Ende der 6-tägigen Inkubation mit IL-4 und GM-CSF und des Differenzierungsprozesses von Monozyten zu unreifen DCs, konnte mikroskopisch die Ausbildung von Zellausläufern, einem morphologischen Charakteristikum unreifer DCs, nachvollzogen werden (siehe Abb.24).

Ähnliche Zellausläufer werden auch von Nervenzellen ausgebildet und dort als Dendriten bezeichnet. Durch die morphologische Ähnlichkeit der Zellausläufer auf DCs mit Dendriten auf Nervenzellen lässt sich die Namensgebung der Dendritischen Zelle herleiten.

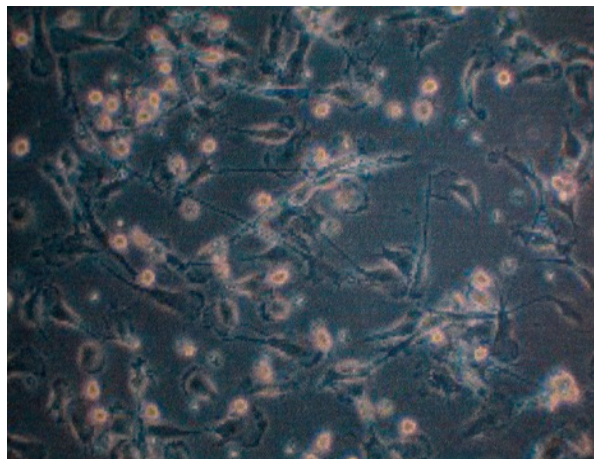


Abb. 24: DCs nach 6-tägiger Inkubation mit IL-4 und GM-CSF (Vergrößerung 1:20):

Die nach der Differenzierung aus Monozyten ausgebildeten Zellausläufer sind an den dunkleren Dendritischen Zellen deutlich zu erkennen.

3.2.2 Morphologie in der Durchflusszytometrie

Als Ausgangszellen für die Erzeugung unreifer DCs dienten Monozyten, deren Anteil aus PBMC an der Expression des Glykoproteins CD14 gemessen wurde, welches auf Makrophagen und Monozyten, nicht jedoch auf Lymphozyten beobachtet wird. Eine grobe Differenzierung war auch anhand der Granularität und Zellgröße möglich (siehe Abb.25).

In sechs unabhängigen Experimenten wurde vor Inkubation mit IL-4 und GM-CSF ein durchschnittlicher Monozyten-Anteil an den PBMCs von 76% gemessen. Die Spannweite reichte dabei von 65 % bis 89% (Daten nicht gezeigt).

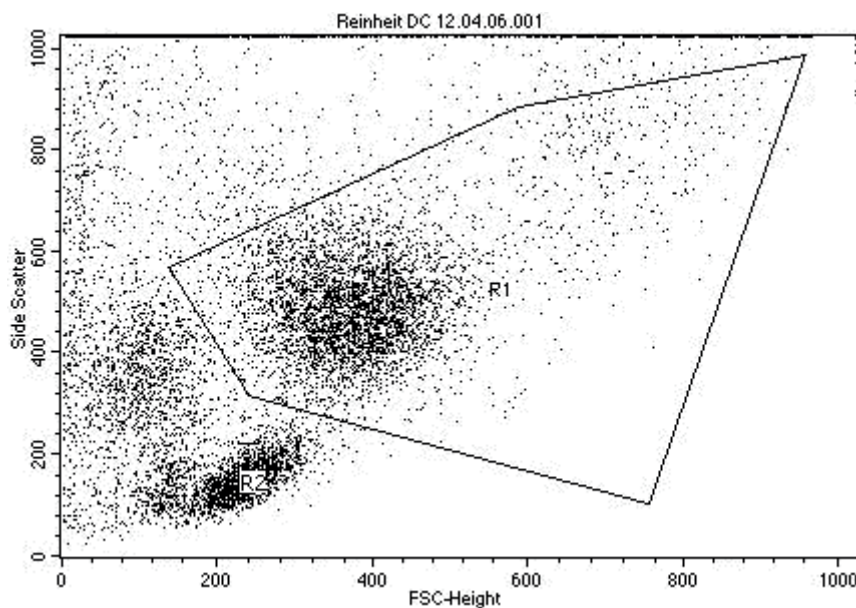


Abb. 25: Exemplarischer Dot-Blot:

Dargestellt ist ein exemplarischer Dot-Blot mit dem Seitwärtsstreulicht (*Side-Scatter*) auf der Y-Achse und dem Vorwärtsstreulicht (*Forward-Scatter*, FSC) auf der X-Achse. R1 bezeichnet die Zielpopulation.

Die Darstellung illustriert die selbst ohne Fluoreszenzfarbstoffe mögliche Differenzierung von Lymphozyten (R2) und Monozyten (R1) anhand ihrer Größe und Granularität.

Nach 6-tägiger Inkubation dieser Monozyten-Population mit IL-4 und GM-CSF wurden die Zellen erneut auf die Expression von CD14 überprüft. Wie zu erwarten konnte auf den differenzierten Zellen der Monozyten-Marker CD14 durch Fluoreszenz nicht mehr detektiert werden.

Zur durchflusszytometrischen Differenzierung des Reifezustandes der generierten moDCs wurden als Marker für die Ausreifeung CD83 und CD86 verwendet. Die Fähigkeit zur Ag-Präsentation wurde anhand der MHCII-Expression nachvollzogen.

Das Transmembranprotein DC-Sign, welches u.a. an der Ag-Aufnahme beteiligt ist, wird bekanntermaßen vor allem in unreifen DCs exprimiert und hat vielfältige Funktionen inne (siehe Kapitel 1.4).

Unbehandelte DCs zeichneten sich durch niedrige Fluoreszenzen für die Reifemarker CD83 und CD86 aus. Ebenso wurde für MHCII ein verhältnismäßig niedriges Fluoreszenzsignal gemessen. Für DC-Sign konnte auf unbehandelten DCs die höchste Expression nachgewiesen werden.

Eine alleinige Inkubation mit 25 µg/ml GdA bewirkte im Vergleich zu unreifen moDCs eine marginale Erhöhung der Expression kostimulatorischer Moleküle CD83 und CD86. Auch MHCII wurde vermehrt präsentiert. DC-Sign blieb im Vergleich zu unbehandelten DCs nahezu unverändert stark exprimiert.

Nach der Reifeinduktion durch TNF-α und IL-1β zeigten DCs ohne GdA-Einfluss den erwarteten Anstieg an den kostimulatorischen Molekülen CD83 und CD86. Auch für MHCII wurde nach Stimulation ein stärkeres Fluoreszenzsignal gemessen. Für DC-Sign konnte nach Stimulation eine markante Reduktion der Expression dokumentiert werden.

Stimulierte moDCs, die zuvor der Wirkung von GdA ausgesetzt waren, unterschieden sich von ihren stimulierten Pendanten ohne GdA-Einfluss durch eine verringerte Präsentation kostimulatorischer Moleküle und eine niedrigere Expression von MHCII. In Bezug auf DC-Sign detektierten wir eine Fluoreszenzintensität, die zwischen der reifer und unreifer moDCs lag. In vier aus sechs voneinander unabhängigen Experimenten konnte eine für DC-Sign deutlich positive Population unter GdA-Einfluss und Stimulation beobachtet werden.

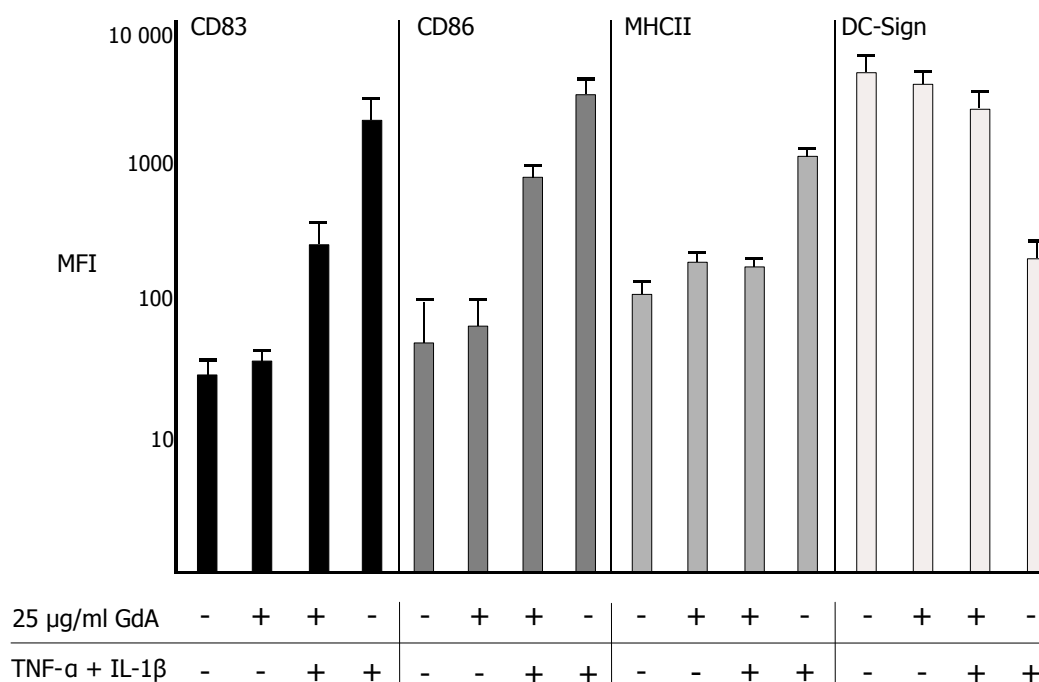


Abb. 26: Expression von Reifemarkern und DC-Sign auf moDCs:

An der Ordinate ist der Median über die Mean Fluoreszenzindizes (MFI) aller sechs Experimente, welche als Unikat ausgeführt wurden, mit dem Standardfehler des Medians (\pm S.E.M.) abzulesen. Die DCs eines Experimentes stammen dabei von jeweils einem Spender.

Die Inkubationsbedingungen der MoDCs sind auf der Abszisse durch + bzw. - gekennzeichnet. MoDCs wurden für 24 h mit 25 µg/ml GdA behandelt, mit TNF-α und IL-1β ausgereift und nach 48 h in der Durchflusszytometrie analysiert.

Die beschriebene Suppression von DC-Sign durch die Reifeinduktoren konnte nach dem Kontakt der DCs mit GdA nicht mehr im vollen Ausmaß abgebildet werden.

Die Wirkung einer Präinkubation mit 10 µg/ml GdA auf die Expression der untersuchten Oberflächenmarker war vernachlässigbar gering. Bei 50 µg/ml zeigte sich ein ähnliches Muster wie für 25 µg/ml beschrieben. Bei höheren bzw. niedrigeren GdA-Konzentrationen konnte keine eindeutig DC-Sign-positive moDC-Population gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt resultierte die primäre Inkubation mit GdA in einer verminderten Induktionsfähigkeit von moDCs zur morphologischen Ausreifung. Diese Veränderung fand Ausdruck in einer verringerten Induzierbarkeit der Oberflächenmarker CD86 und CD83 und von MHCII. Die durch Reifeinduktion erwartete Suppression von DC-Sign wurde teilweise durch GdA gehemmt.

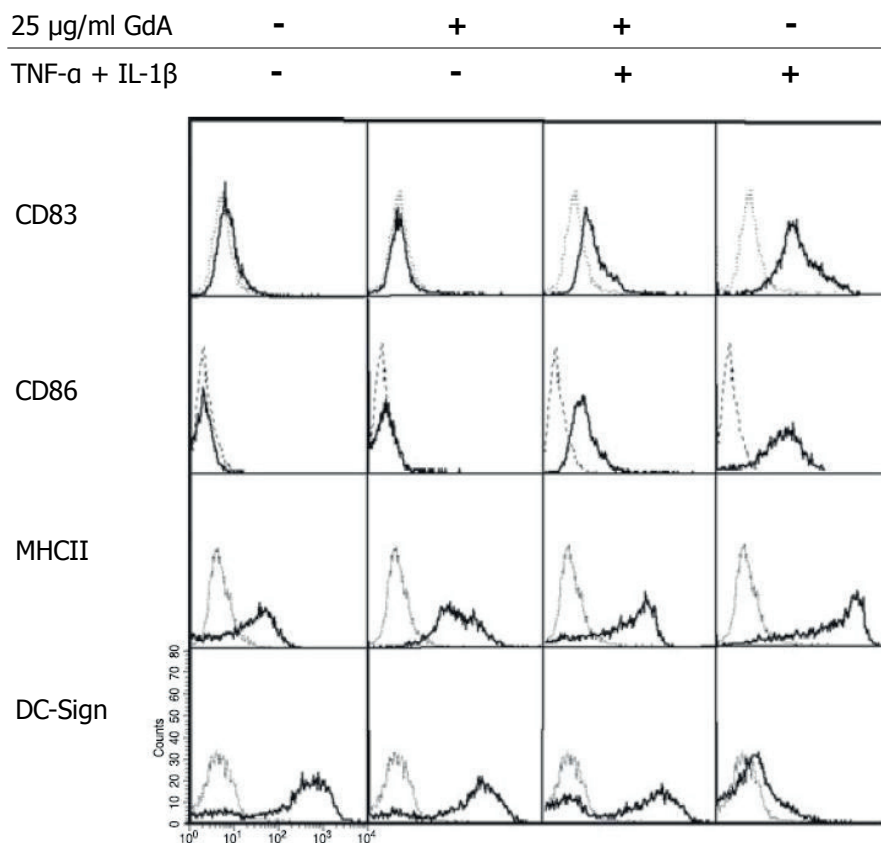


Abb. 27: Expression von Reifemarkern und DC-Sign im Histogramm:

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von insgesamt sechs unabhängigen Experimenten, welche als Unikate durchgeführt wurden. Gepunktete Linien markieren Isotypenkontrollen. Für jedes einzelne Kästchen wurden an der Ordinate die *Counts*, die Anzahl der gemessenen Zellen aufgetragen. An der Abszisse jedes Kästchens ist die Fluoreszenzintensität dargestellt.

Horizontal sind die einzelnen Histogramme jeweils in einer Zeile für den untersuchten Oberflächenmarker angeordnet. Die Spalten geben die Inkubationsbedingungen der MoDCs an.

3.3 Funktionelle Charakterisierung Dendritischer Zellen

3.3.1 Endozytotische Aktivität

Die Fähigkeit zur kontinuierlichen Antigenaufnahme und zur Antigenpräsentation bei fehlender Kostimulation ist ein Charakteristikum unreifer DCs.

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, regulieren moDCs in dem Prozess der Ausreifung ihre endozytotische Aktivität nach unten und präsentieren ihre Ag gemeinsam mit kostimulatorischen Molekülen in einer stabilen Art und Weise, die letztendlich immunstimulierend wirkt. Dadurch, dass die Dendritischen Zellen keine neuen Ag mehr aufnehmen, wird zudem sichergestellt, dass dem spezifischen Immunsystem genau diejenigen Ag gezeigt werden, von welchen die DCs zum Zeitpunkt des schädigenden Ereignisses umgeben sind und welche möglicherweise die Schädigung verursachen.

Um den Einfluss von Glycodelin auf die endozytotische Aktivität zu untersuchen, wurden vorinkubierte moDCs für 2 h mit dem fluoreszenzmarkierten Kohlenhydrat FITC-Dextran inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die Aufnahme von FITC-Dextran durchflusszytometrisch dokumentiert (siehe Kapitel 2.5.3).

Im Vergleich zur Positivkontrolle unbehandelter Zellen, welche erwartungsgemäß die höchste Endozytoserate aufwiesen, resultierte die alleinige Behandlung mit GdA in einer etwas verringerten endozytotischen Aktivität, welcher 73% der Positivkontrolle entsprach.

In Relation zu allen weiteren Versuchsansätzen blieb die Endozytose in den moDCs allerdings unter dem Einfluss von GdA bemerkenswert hoch.

Eine Koinkubation der Dendritischen Zellen mit GdA und den Reifeinduktoren TNF- α und IL-1 β bewirkte keine deutliche Reduktion der Dextranaufnahme von diesem Niveau (58% der Positivkontrolle).

Eine signifikante Verringerung auf 31% konnte allerdings in ausschließlich reifeinduzierten Zellen mit einer niedrigen Endozytoserate im Vergleich zu GdA-vorbehandelten DCs beobachtet werden.

Die geringste endozytotische Aktivität wurde, wie erwartet, in der Negativkontrolle Dendritischer Zellen auf Eis gemessen.

Zusammengefasst kann der Effekt von GdA in einer persistierenden endozytotischen Aktivität der moDCs beschrieben werden. Durch Reifestimuli wurde dieser Effekt nur schwach beeinflusst.

Das untersuchte Endozytoseverhalten lässt sich somit in einer durch GdA verursachten, geringeren funktionellen Ausreifung der Dendritischen Zellen nach Reifeinduktion beschreiben.

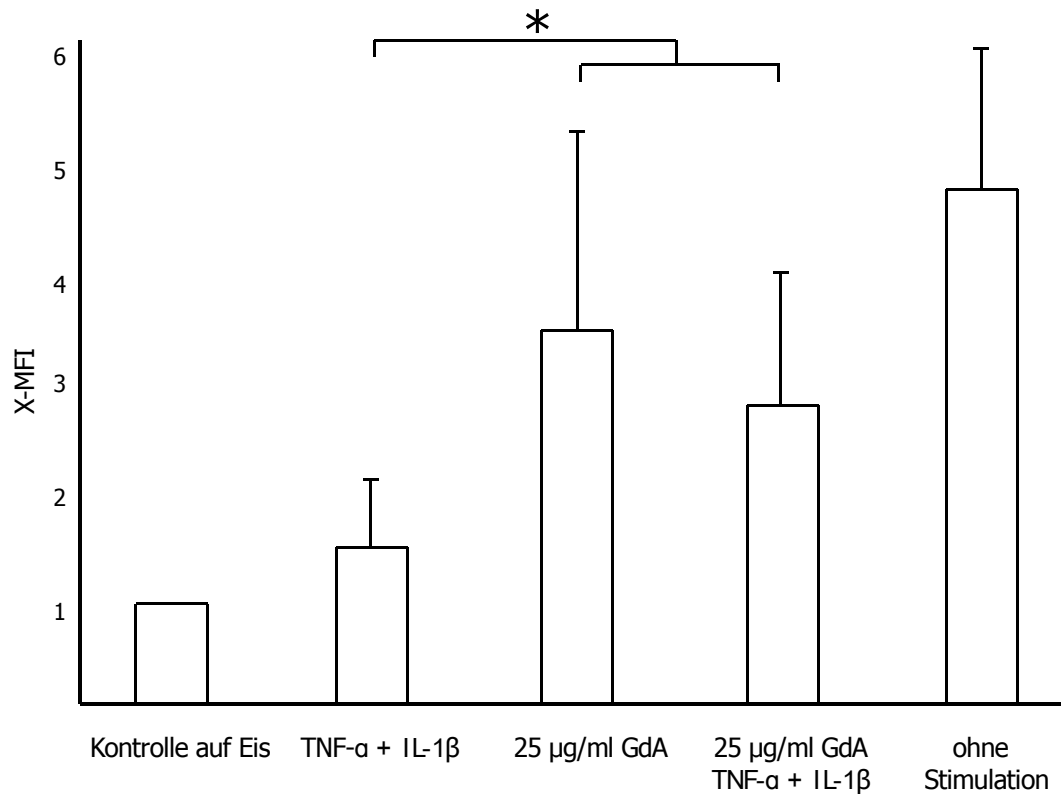


Abb. 28: Endozytotische Aktivität:

Die Vorinkubation mit 25 µg/ml GdA führte zur Persistenz der endozytotischen Aktivität trotz Reifestimulation. DCs wurden mit Fluoreszin Isothiocyanatdextran für 2 h inkubiert. Gezeigt sind die Daten aus fünf Experimenten mit DCs von fünf Spendern. Die Experimente wurden als Unikate in jeweils zwei Ansätzen bei 37° und 0° angesetzt.

Die arithmetisch gemittelten Daten von 5 Experimenten sind gegen Negativkontrollen auf Eis genormt und in Relation zu deren Mean Fluoreszenzindex (MFI) dargestellt. Fehlersäulen zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Klammern und der Stern markieren die statistische Signifikanz.

3.3.2 Lymphoproliferative Aktivität

Um die funktionellen Fähigkeiten von GdA-behandelten moDCs weiter zu erfassen, wurde ihre Kapazität betrachtet, in allogenen gemischten Lymphozyten Proliferation anzuregen.

Dabei bedienten wir uns des synthetischen Nukleosids 5'-Bromo-2'-deoxy-Uridin, welches von proliferierenden Lymphozyten anstelle der Pyrimidinbase Thymin in die DNS eingebaut wird und anschließend im ELISA dargestellt werden kann. Dadurch ist eine Abbildung der lymphozytären Proliferationsrate möglich (siehe Kapitel 2.5.4).

Die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen wurden jeweils für eine Reihe aus fünf verschiedenen Zellverhältnissen von DCs zu Lymphozyten angesetzt. Dies war wichtig, um sicherzustellen, dass die Proliferationsinduktion in unseren Experimenten tatsächlich von den DCs, und nicht von anderen, zufällig vorhandenen Zelltypen – sogenannten *bystanderzellen* – ausging.

Die Ansätze mit dem höchsten DC-Anteil erzielten dabei naturgemäß jeweils die höchste in der proliferative Aktivität Lymphozytenpopulation und umgekehrt die mit der kleinsten DC-Fraktion die niedrigste.

Unbehandelte DCs wiesen die geringste lymphoproliferative Kapazität auf und stellten gewissermaßen die Negativkontrolle des Versuches dar.

Die höchsten Proliferationsraten in den Lymphozyten induzierten Dendritische Zellen aus den Ansätzen mit alleiniger Reifestimulation und ohne GdA-Einfluss.

Bei DCs, die in der Vorinkubation einer GdA-Konzentration von 10 µg/ml ausgesetzt waren, war die lymphoproliferative Kapazität nach der Ausreifung der moDCs im Vergleich zu ausgereiften DCs ohne Gd-Inkubation nur geringfügig vermindert.

Bei der Verwendung höherer Konzentrationen von 25 µg/ml und 50 µg/ml GdA (Daten nicht gezeigt) nahm die durch stimulierte DCs induzierte, lymphozytische Zellteilung sichtbar ab.

Unter alleiniger GdA-Inkubation mit 25 µg/ml ohne anschließende Reifeinduktion wurde in DCs ein Stimulationsvermögen zur Lymphozytenproliferation gemessen, das niedriger war, als in sämtlichen übrigen Inkubationsbedingungen. Lediglich im Vergleich mit gänzlich unbehandelten, unreifen moDCs war die Kapazität der DCs um das Zweifache erhöht.

Eine Erhöhung der GdA-Konzentration auf 50 µg/ml veränderte das proliferationsinduzierende Verhalten nicht (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend führte die Präinkubation mit GdA konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der lymphoproliferativen Aktivität von moDCs. Die alleinige Behandlung mit GdA bewirkte eine im Vergleich zur Negativkontrolle nur diskret erhöhte Proliferation der Lymphozyten in unseren Ansätzen zur Gemischten Lymphozytenreaktion (MLR).

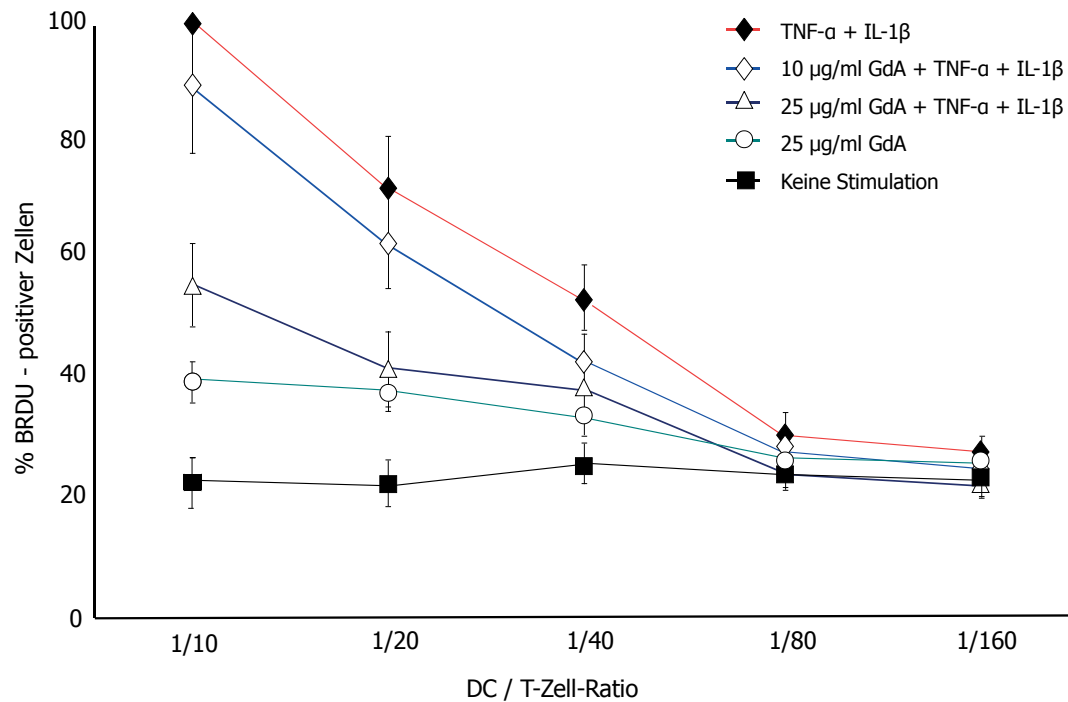


Abb. 29: Lymphoproliferative Kapazität:

Die Vorbehandlung mit GdA bewirkte eine konzentrationsabhängige Reduktion der lymphoproliferativen Aktivität auch unter nachfolgender Reifeinduktion.

Die mit GdA und Reifeinduktoren präinkubierten moDCs wurden mit allogenen nicht adhärenenten peripheren PBMCs in 96-well-Platten zu den angegebenen Verhältnissen koinkubiert. Die Verhältnisse von Dendritischen Zellen zu T-Lymphozyten sind bei einer konstanten Lymphozytenkonzentration von $2 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ an der X-Achse abzulesen.

Der Prozentsatz BRDU-positiver Zellen wurde photometrisch bestimmt und ist auf der Ordinate aufgetragen. Die abgebildeten Daten repräsentieren den medianen BRDU-Uptake aus sechs unabhängigen Experimenten, welche mit Zellen unterschiedlicher Spender in jeweils drei parallelen Ansätzen, als Triplikate durchgeführt wurden.

Die jeweilige Standardabweichung vom Median ist in Fehlerbalken dargestellt. Die Daten wurden normiert gegen ein Inkubationsverhältnis von 1:10 aus ausgereiften GdA-naiven DCs zu T-Zellen (100% BRDU-Uptake). Die Relation zwischen DCs und T-Zellen ist auf der X-Achse abzulesen.

3.3.3 Zytokinsekretion

MoDCs produzieren nach ihrer Aktivierung durch Stimuli wie TNF- α , Prostaglandin E₂, IL-1 β , IL-6 oder Purinderivate das Th1-Zytokin IL-12. Das Th2-Zytokin IL-10 ist in MoDCs durch *B-cell-activating factor* (BAFF) aus der Superfamilie der TNF-Liganden und Interferon- β (INF- β) induzierbar (siehe Abb.1c).

IL-12 und IL-10 sind Protagonisten und häufig Antagonisten in verschiedenen Formen der Immunstimulation und Tolerogenese und erlauben eine grobe Charakterisierung der Immunantwort, welche unter dem Einfluss von GdA durch moDCs angestoßen wird.

Daher bestimmten wir mittels ELISA die Sekretion dieser Zytokine in den Kulturüberständen der Dendritischen Zellen unter den beschriebenen Inkubationsbedingungen (siehe Kapitel 2.5.5).

In unbehandelten moDCs stellte sich der IL-10-Median bei 42 pg/ml ein (in einem Bereich von 23-55 pg/ml). Dies war der in allen Ansätzen niedrigste IL-10-Spiegel im Überstand. IL-12 war unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar.

Die Stimulation mit TNF- α und IL-1 β ergab die höchste nachvollzogene IL-12-Sekretion mit einem Median um 4,26 ng/ml (Bereich 2,62-6,86 ng/ml) und einer medianen IL-10-Sekretion von 83 pg/ml (Bereich 23-165 pg/ml).

Das Sekretionsverhalten der moDCs änderte sich deutlich Richtung IL-10-Dominanz, wenn vor der Reifeinduktion 25 μ g/ml Glycodelin zugegeben wurde. Bei diesem Ansatz betrug der gemessene mediane Wert für die IL-12p40-Sekretion 1,08 ng/ml (Bereich 0,11-2,36 ng/ml), wohingegen IL-10 eine mediane Konzentration von 311 pg/ml (Bereich 197-475 pg/ml) einnahm.

Bei alleiniger GdA-Inkubation ohne Reifeinduktoren verringerte sich die Zytokinsekretion erheblich. Nach Einwirkung von GdA auf die moDCs ohne nachfolgende Ausreifung lag IL-10 im Median bei 69 pg/ml (Bereich 80-50 pg/ml). Unter diesen Bedingungen war von IL-12 nur noch eine Spur messbar.

Eine Erhöhung der GdA-Konzentration auf 50 μ g/ml veränderte dieses Sekretionsmuster nicht. Auch eine Erniedrigung auf 5 oder 10 μ g/ml GdA konnte keine statistisch signifikante Veränderung herbeiführen.

Der Effekt einer GdA-Inkubation auf Dendritische Zellen bildete sich in einem veränderten Sekretionsverhalten für bestimmte Zytokine ab. Letzteres kann durch eine Erhöhung der IL-10-Sekretion bei gleichzeitiger Drosselung der IL-12-Sekretion beschrieben werden.

Im Ganzen weisen die Ergebnisse unserer Versuche zur funktionellen Charakterisierung der moDCs auf eine GdA-Wirkung hin, welche sich in einer schwächeren funktionellen Ausreifung der Dendritischen Zellen nach Reifeinduktion niederschlägt.

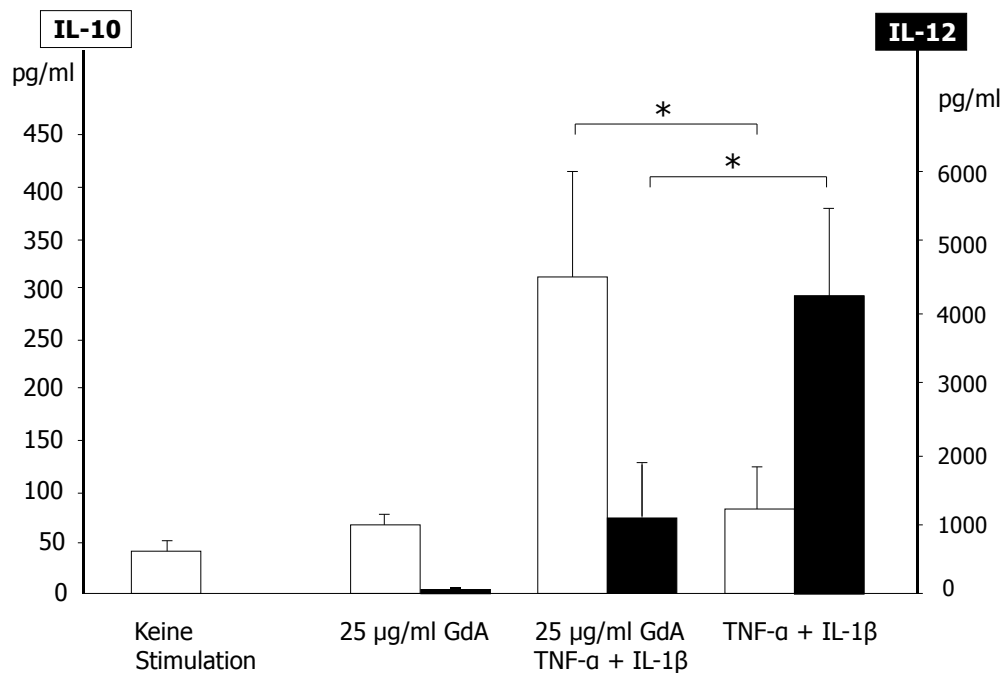


Abb. 30: IL-10-dominantes Muster ausgereifter moDCs unter GdA:

Die Inkubation mit GdA vor der Reifeinduktion ergab ein Zytokinmuster mit hohen Konzentrationen für IL-10 und niedrigen für IL-12. Bei GdA-Inkubation ohne Reifeinduktion hingegen blieb eine signifikante Induktion von IL-10 aus.

Eine alleinige Reifeinduktion mit TNF- α und IL-1 β resultierte, wie erwartet, in einer hohen Expression von IL-12 und niedrigem IL-10.

Gezeigt ist der Median aus sechs unabhängigen Experimenten, welche als Unikate durchgeführt wurden. Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler des Medians an. Die Klammern und Sterne zeigen die statistische Signifikanz.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen vollzog sich *in vitro* und konnte im Phasenkonstrastmikroskop morphologisch an der Ausbildung von Dendriten und an der fehlenden CD14-Expression in der Durchflusszytometrie nachvollzogen werden.

Um die Glycodelin-Wirkung darzustellen, untersuchten wir im Experiment die morphologischen und funktionellen Veränderungen in Monozyten-abgeleiteten Dendritischen Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit chromatographisch aus Fruchtwasser aufgereinigtem Glycodelin A.

Nach GdA-Exposition wurden folgende morphologische Unterschiede festgestellt:

MoDCs änderten nach dem Kontakt mit GdA die Expression von CD83 und CD86, zweier kostimulatorischer Moleküle nicht signifikant. Interessanterweise konnte durch eine Exposition zu den Reifeinduktoren TNF- α und IL-1 β die Präsentation dieser Reifemarker nicht induziert werden.

Die Kapazität zur Antigenpräsentation verringerte sich durch Glycodelin, was an einer reduzierten Expression von MHC-Molekülen der Klasse II nachvollzogen wurde.

Eine Rezeptorvermittlung dieser Effekte konnten wir bisher nicht nachweisen. Allerdings fiel auf, dass das C-Typ Lektin DC-SIGN auf moDCs nach GdA-Inkubation signifikant erhöht war und durch Reifestimulation nur schwach supprimiert werden konnte.

Die Ergebnisse der funktionellen Experimente fügen sich gut in dieses Bild:

In den Ansätzen mit GdA-Einwirkung nahm die Fähigkeit von moDCs, in Lymphozyten Proliferation zu induzieren, dosisabhängig ab. Die Endozytosefähigkeit, welche v.a. in unreifen Dendritischen Zellen ausgeprägt ist, blieb auch unter Reifeinduktion erhalten.

Das Profil der sezernierten Zytokine IL-12 und IL-10 verschob sich Richtung des tolerogenen IL-10, wobei die immunogene IL-12-Sekretion nach GdA-Inkubation inhibiert war.

Diese Ergebnisse bestätigen unsere Arbeitshypothese, dass humanes Glycodelin A *in vitro* immunmodulatorisch auf humane, Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen wirkt. In der Zusammenschau dieser Befunde entsteht der Eindruck, dass Glycodelin A einen halbreifen Aktivierungszustand in moDCs fördert.

4. Diskussion

In dieser Arbeit werden die Daten aus unseren Versuchen zum Einfluss von Glycodelin A auf Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen (moDCs) präsentiert. Die Experimente zeigen, dass moDCs nach Vorbehandlung mit GdA morphologische und funktionelle Veränderungen durchlaufen. Im Folgenden sollen unsere Ergebnisse vor dem aktuellen Stand der Wissenschaft diskutiert und in bereits erkannte Zusammenhänge eingeordnet werden.

4.1 Isolierung von Glycodelin A

Die Isolierung von GdA aus Amnionflüssigkeit erfolgte mittels sequentieller FPLC unter anschließender Kontrolle der Reinheit und dem Ausschluss einer möglichen LPS-Kontamination.

Das Verfahren der Aufreinigung aus Fruchtwasser war notwendig, um Glycodelin A mit seiner einzigartigen spezifischen Verzuckerung zu gewinnen. Bisher ist die Erzeugung von rekombinantem Gd nur ohne Glykosilierung möglich. Alok et al gelang 2008 erstmals die Herstellung von rekombinantem Glycodelin (rGd) mit Glykosilierung (Alok et al. 2008). Allerdings ist bis auf das MG über die Art der Glykosilierung noch vieles im Dunkeln, auch fehlt die typische Syialisierung. Da Struktur und Funktion des Glykoproteins jedoch von beidem entscheidend abhängen (siehe Kapitel 1.5), waren wir auf GdA aus Fruchtwasser des Mitt-Trimesters angewiesen, welches eine gute Quelle für dessen Aufreinigung bietet (Riittinen et al. 1989a).

Im Chromatogramm des letzten Chromatographieschrittes auf einer Phenylsäule Resource Phe sind eine Hauptspitze für GdA und benachbart sekundäre Spitzen sichtbar (siehe Abb.19). Diese kleineren Spitzen gehören zu dem gleichen Protein und werden durch Änderungen in der Glykosilierung, z.B. Desyialisierung bzw. durch Splice-Varianten verursacht.

GdA wurde im Dot-Blot und Westernblot über einen polyklonalen Antikörper identifiziert, welcher ein distinktes Proteinepitop mit 15 Aminosäuren nahe dem Carboxyl-Ende von humanem Glycodelin erkennt. Der Ak wurde im Gegensatz zu früheren Verfahren in der Ziege generiert und markierte im Westernblot eine spezifische Bande bei ca. 28 kDa, dem von Riittinen beschriebenen Molekulargewicht für Gd bei 27-29 kDa (Riittinen 1989b).

Apoptoseinduktion in moDCs

Die bereits erwähnte Frage nach der Fähigkeit von GdA, in Monozyten Apoptose zu induzieren, ist bislang nicht eindeutig geklärt (siehe Kapitel 1.5.4). Die Arbeitsgruppe um Alok vermutete eine Apoptoseinduktion durch Gd in undifferenzierten Monozyten (Alok et al. 2008).

Die Apoptoseinduktion rekombinanten Glycodelins wurde mit einer verminderten Expression der antiapoptotischen Moleküle APRIL und Bcl-2A1 sowie einer verminderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear-Factor-κB* (NF-κB) durch TNF-α in Zusammenhang gebracht.

Ein proapoptotischer Effekt von GdA wurde dabei bereits bei einer Konzentration von 3,2 µg/ml gemessen (Tee et al. 2008). Kürzlich wurde eine Publikation veröffentlicht, der zufolge GdA über L-Selektine an Makrophagen bindet, was über eine verstärkte Expression von IL-6 zu einer Th1-Zell-Suppression führt (Lee et al. 2012). Für rekombinantes GdA ohne die relevante Glykosilierung wurde dieser Effekt nicht nachgewiesen.

In unseren Versuchsreihen konnten wir unter den GdA-Konzentrationen bis 25 µg/ml keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Zellsterblichkeit und GdA-Konzentration feststellen. Erst ab Konzentrationen von 50 µg/ml GdA wuchs die Zytotoxizität und die Ratio abgestorbener Zellen an. Mit dem angewandten Trypanvitalitätstest konnte allerdings nicht zwischen Nekrose und Apoptose unterschieden werden. Auch das Profil der IL-10-Sekretion aus unseren Experimenten spricht gegen einen direkten zytopathischen Effekt von GdA auf moDCs.

Diese Beobachtung ist möglicherweise durch den Differenzierungsprozess unserer adhärenenten Zellen nach 6-tägiger Inkubation mit GM-CSF und IL-4 zu erklären, denn für differenzierte Zellen konnte kein apoptotischer Effekt beobachtet werden. Ein weiteres Motiv ist in der Syialisierung sowie Glykosilierung zu sehen, welche die apoptoseinduzierende Funktion des Proteinrückgrates des Glykoproteins modulieren und sich in den einzelnen Chargen der Aufreinigung als inhomogen erweisen können (Karande et al. 2005). Vor diesem Hintergrund setzten wir in unseren Versuchsreihen Glycodelin vor allem in den angegebenen Konzentrationen bis 25 µg/ml ein.

Blockierungsversuche

Das Experiment mit blockierenden Antikörpern ist bedeutsam, um die Reversibilität der GdA-Wirkung nachzuweisen. Auch ein Nachweis der Spezifität der nachgewiesenen immunmodulatorischen Wirkung für GdA ist dadurch möglich.

Allerdings lässt der angewandte Aufreinigungsprozess von Glycodelin aus Fruchtwasser mittels Chromatographie mit dem Nachweis einer spezifischen Bande im Westernblot nicht auf eine Verunreinigung durch weitere im Fruchtwasser vorkommende immunmodulatorische Moleküle schließen. Eine sekundär aufgetretene Verunreinigung der Proben (durch Immunstimulatoren oder Endotoxine) nach oder während des Aufreinigungsprozesses konnte durch eine negative Testung der Glycodelinchargen auf Induzierbarkeit von TNF-Alpha in Monozyten ausgeschlossen werden. In der Literatur wurde in bisherigen Experimenten zur GdA-Wirkung auf Lymphozyten (Lee et al. 2011) und Monozyten (Alok et al. 2008) sowie NK-Zellen (Lee et al. 2010) ebenfalls auf Blockierungsversuche verzichtet.

Hinzuzufügen ist, dass die Chargen von Glycodelin O und Glycodelin A von den selben Doktoranden mit den gleichen Verfahren zeitlich parallel aufgereinigt wurden. Auch unter diesem Aspekt ist eine Verunreinigung der Glycodelin A Chargen durch die bewiesene Spezifität der Glycodelin O-Wirkung im Blockierungsversuch zwar nicht auszuschließen, aber als unwahrscheinlich anzunehmen.

4.2 Generierung von Dendritischen Zellen

Der zirkulierende Anteil von DCs ist mit weniger als einem Prozent der mononukleären Zellen (Steinman 1991) zu gering für eine suffiziente Zellgewinnung, so dass wir in unseren Versuchen Monozyten-abgeleitete DCs verwendeten. Die Kultivierung der moDCs folgte einem seit 1994 etablierten Verfahren (Sallusto et al. 1994; Bender et al. 1996), nach welchem sich mit Hilfe von IL-4 und GM-CSF CD14⁺Monozyten zu unreifen DCs differenzieren, die funktionell analog sind zu myeloiden peripheren Gewebe-DCs.

Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob der Differenzierungspfad von Monozyten zu Dendritischen Zellen *in vivo* diesem *in vitro* Modell entspricht (Bancherau et al. 2005), allerdings haben beide Zelllinien einen gemeinsamen CD14⁺ Vorläufer (Romani et al. 1994) und im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass Langerhanszellen direkt aus Monozyten hervorgehen (Ginhoux 2006).

GM-CSF begünstigt das Überleben von Monozyten *in vitro* und unterstützt deren Differenzierung zu DCs (Conti et al. 2008). IL-4 hingegen reguliert die CD14-Expression herab, wodurch das Differenzierungspotential der DC-Progenitoren zu Makrophagen reduziert wird (Jansen 1989). In unseren Versuchen wurde IL-4 dem äquivalent gebrauchten IL-13 vorgezogen, da es eine höhere Effizienz bzgl. der Differenzierung zu moDCs zeigt (Ahn et al. 2005).

Bei dem Einsatz von IL-4 und IL-13 ist ein besonderer Umstand zu bedenken: Beide Th2-Zytokine inhibieren die Produktion des Th1-Zytokins IL-12p40. Diesen Effekt üben sie allerdings nur bei einer Inkubation unter 24 h aus. Danach verkehrt sich ihre Wirkung ins Gegenteil und führt zu einer Amplifikation der Transkription von IL-12p40 und IL-12p35, welche sogar größer ist als bei INF- γ (Marshall et al. 1997; D'Andrea et al. 1995). Diese bimodale Funktionsweise könnte durch unsere sechstägige Inkubation mit GM-CSF und IL-4 in den *in vitro* generierten moDCs eine höhere Bereitschaft zur IL-12-Produktion erzeugt haben als bei *ex vivo* aufgereinigten Zellen (Kalinski et al. 2000). Berücksichtigung sollte dieser Umstand vor allem im Vergleich mit Studien finden, in denen *ex vivo* gewonnene Zellen eingesetzt werden.

Innerhalb unserer Versuchsreihen waren die Bedingungen stets gleich, so dass sich durch diesen Effekt lediglich eine erhöhte Produktionsbereitschaft ableiten lässt. Für die tatsächliche Produktion sind jedoch weitere Einflüsse notwendig, welche schließlich zu den signifikanten Sprüngen in den unterschiedlichen Ansätzen geführt haben.

Reifeinduktion

Der Prozess der Ausreifung befähigt DCs zur funktionellen Bahnung von naiven T-Zellen in ihre Effektor Klassen und zu einer Ag-spezifischen Immunantwort. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben sind die physiologischen Auslöser dafür Gefahrensignale, wie z.B. PAMPs oder DAMPs, Signale von T-Zellen und Zytokine. In experimentellen Settings werden v.a. kommerziell erhältliche inflammatorische Signale, bakterielle Derivate wie LPS oder bakterielle RNA bzw. T-Zell-Derivate

benutzt, um in DCs Ausreifung zu induzieren. Den lange gültigen Goldstandard für die Produktion für *good manufacturing practise (GMP)-grade DCs* entwickelte 1997 Jonuleit mit IL-6, TNF- α , IL-1 β und PGE₂ (Jonuleit et al. 1997). In unseren Experimenten kamen zur Reifeinduktion IL-1 β und TNF- α zum Einsatz.

TNF- α wurde schon früh als Induktor der DC-Migration in LK erkannt (Cumberbatch et al. 1992). Sezerniert wird das proinflammatorische Zytokin von aktivierten Makrophagen (Matthews 1978) und T-Lymphozyten und übt über zwei Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, welche auf fast allen kernhaltigen Zellen zu finden sind, vielfältige Effekte im Entzündungsgeschehen, der Immunität sowie dem programmierten Zelltod aus. In DCs bewirkt es eine Hochregulierung von Oberflächenmolekülen, wie CD80, MHCI und MHCII. Zudem steigert es ihre Kapazität zur Induktion der T-Zell-Proliferation (Ritter et al. 2003), die bereits 1997 von Hart als Grundbedingung in der Arbeitsdefinition für DCs gefordert wurde (Fearnley et al. 1997; Hart 1997).

IL-1 β wird von Monozyten und Makrophagen sezerniert und wurde als CD40-Induktor im Reifungsprozess von Langerhanszellen bereits 1996 beschrieben (Ozawa et al. 1996). Auch in moDCs moduliert es die CD40L-induzierte Zytokinsekretion und Aktivierung (Luft et al. 2002). Darüber hinaus stimuliert IL-1 β Lymphozyten, stößt die Akute-Phase-Reaktion an und ist pyrogen (Dinarello 1984). In jüngerer Zeit wird eine therapeutische Blockierung der IL-1 β -Wirkung in inflammatorischen Prozessen diskutiert (Dinarello 2011).

PGE₂ führt über eine vermehrte Chemokinexpression wie CCR7 in MoDCs zur Chemotaxis zu T-Zell-reichen Lymphknoten-Arealen (Bruckner et al 2012), was evtl. unsere Experimente hinsichtlich der lymphoproliferativen Kapazität beeinflusst hätte. Eine Erhöhung der T-Zell-Proliferation durch PGE₂ über die Induktion kostimulatorischer Moleküle auf DCs wurde bereits 2009 von Krause beschrieben (Krause et al. 2009). Bei der IL-12 wird die IL-12 p35 Kette des Moleküles nicht exprimiert, so dass selbst durch Stimulation mit LPS oder CD40L kein funktionsfähiges IL-12 produziert wird (Kalinski et al. 2011). Wie auch für IL-6 ist für PGE₂ bekannt, dass es die IL-12-Sekretion verringert und zu einem falsch niedrigen Ergebnis in der Zytokinsekretion führt (Lee et al. 2002). DCs unter PGE₂-Einfluss wurden als *myeloid-derived suppressor cells* beschrieben, welche die zytotoxische Aktivität von T-Zell-Antworten unterdrücken (Obermayer et al.2010).

Eine suffiziente IL-12-Sekretion durch ausgereifte DCs ist eine Grundvoraussetzung, um den Einfluss von GdA auf die Immunkompetenz Dendritischer Zellen darzustellen. Daher verzichteten wir auf den Einsatz von IL-6 und PGE₂.

4.3 Morphologische Veränderungen Dendritischer Zellen durch Glycodelin A

Die Auswahl der betrachteten Oberflächenmoleküle richtete sich danach, den Reifezustand und die Funktionalität der moDCs zu beurteilen. Im Folgenden sollen die einzelnen Marker kurz vorgestellt werden.

CD83 ist ein stark glykosilierter Marker zur Identifizierung reifer DCs und wird strukturell der Ig-Superfamilie zugeordnet (Zhou et al. 1995). *In vitro* exprimieren MoDCs CD83 nach Inkubation mit IL-4 und GM-CSF. Um eine vollständige Expression zu erreichen, muss allerdings TNF- α zugesetzt werden (Zhou et al. 1996). *In vivo* wird das transmembrane Molekül auf reifen, nicht-follikulären DCs wie Langerhanszellen, im Thymus und auf Retikulumzellen im lymphoiden Gewebe exprimiert, aber auch auf aktivierten Lymphozyten, Neutrophilen und Makrophagen gefunden (Breloer et al. 2008). CD83 ist an der Einstellung des Turnovers von MHCII-Molekülen auf DCs und damit an der T-Zell-Regulation beteiligt (Lechmann et al. 2008). Experimentell kann die allogene T-Zell-Stimulation durch eine verringerte CD83-Expression humaner DCs gehemmt werden (Prechtel et al. 2007). Eine passagere Überexpression von CD83 auf DCs führt hingegen zu einer Erhöhung der T-Zell-stimulatorischen Kapazität (Aerts-Toegaert et al. 2007).

Neben der membrangebundenen Form gibt es im humanen Serum auch lösliches CD83, welchem eine Rolle in der Regulation von Lymphozyten und in der Toleranzinduktion zugesprochen wird (Lan et al. 2010).

CD86 ist, wie CD80 und B7.3, der B7-Familie kostimulatorischer Ig-Rezeptoren zugeordnet, welche für eine komplette T-Zell-Aktivierung als Ligand von CD28 notwendig sind (Larsen et al. 1994). Ohne CD86 nehmen T-Zellen einen Zustand der Anergie ein oder werden apoptotisch (Thomas et al. 2007). In Mäusen konnte durch die Blockade von CD86 eine Störung des Ig-Klassenwechsels und eine insuffiziente Ak-Antwort beobachtet werden (Borriello et al. 1997).

Exprimiert wird CD86 konstitutiv auf ruhenden APCs, wie DCs oder B-Lymphozyten (Freeman et al. 1991) sowie durch aktivierte T-Zellen (Hathcock et al. 1994) und erreicht die Spitzenwerte der Expression 18-24 h nach der Stimulation (Lenschow et al. 1993). In unseren Experimenten wurde die Expression 24 h nach Stimulation gemessen.

Humane Leukozytenantigene (HLA) gehören der Gruppe der MHC-Moleküle an, welche in allen Wirbeltieren ab dem Knorpelfisch zu finden sind. Diese Proteine reflektieren Informationen über den Proteinbestand einer Zelle und über internalisierte fremde Proteine auf deren Oberfläche (siehe Kapitel 1.3). Insgesamt unterscheidet man drei Gruppen von MHCs: Die Klassen I und II tragen über die Aktivierung spezifischer Lymphozyten zur adaptiven Immunantwort bei. Plasmaproteine, wie z.B. die Komplementfaktoren C2 und C4 bilden die Klasse III.

In den beschriebenen Experimenten wurde HLA-DR gemessen, welches zu den MHCII-Molekülen zählt und durch DCs, Makrophagen, B-Zellen und aktivierte T-Zellen exprimiert wird. Die Funktion der MHCII-Moleküle wird in der Präsentation von extra- und intrazellulären Fremdantigenen gegenüber CD4⁺-T-Zellen gesehen. Da nach Immunstimulation eine erhöhte Dichte von HLA-DR auf der Zelloberfläche auftritt, wird es auch als Stimulationsmarker benutzt.

DC-Sign wurde in der Einleitung bereits angesprochen (siehe Kapitel 1.4) und verkörpert den vierten Oberflächenmarker, der für uns von großem Interesse war. Er wird in der Literatur auch als *Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non integrin* oder CD209 bezeichnet und stellt ein humanes, transmembranes C-Typ Lektin (CLR) vom Typ II mit Ag-aufnehmenden und Adhäsions-fördernden Eigenschaften dar.

In unserem *in vitro* Model führte die Reifeinduktion mit IL-1 β und TNF- α zu einem vollständig ausgereiften Phänotypen mit hoher Expression von CD86 und CD83. Auch die Fähigkeit zur Ag-Präsentation stieg mit der Expression von HLA-DR an. DC-Sign wurde nach dem Kontakt mit Reifestimuli dagegen vermindert präsentiert (siehe Kapitel 3.2.2).

Die Behandlung mit GdA vor einer Exposition mit Reifestimuli veränderte die Reaktion der moDC deutlich: CD83 und CD86 zeigten im Vergleich zur beschriebenen Standardausreifung eine signifikant abgeschwächte Induzierbarkeit, was einer verminderten T-Zell-stimulatorischen Kapazität gleichzusetzen ist.

Dafür spricht auch das gemessene intermediäre Niveau an HLA-DR nach Vorinkubation mit GdA. Der mediane Fluoreszenzindex für diese Parameter spiegelt einen Zustand wieder, der sich als halbreif bezeichnen lässt.

Dies passt zu unseren Versuchen zur lymphoproliferativen Kapazität (siehe Kapitel 4.4.2) und zu der Beobachtung, dass halbreife DCs unter den Bedingungen eines Fließgleichgewichtes tolerogen sein können (Jonuleit et al. 2000; Steinman et al. 2003).

Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt ist die kontrovers diskutierte Hypothese, dass CD86 im Gegensatz zu DC80 die Th1-Polarisierung mediert oder begünstigt (Kuchroo et al. 1995; MacPhee et al. 2001; Bhatt et al. 2009). Der Einsatz von Anti-B7-Ak am 4. Gestationstag führt zu einer gesteigerten Th2- und verminderten Th1-Produktion, sowie zu vermehrtem fetalen Überleben in Abort-gefährdeten Mäusen (Jin et al. 2006).

Vor diesem Hintergrund könnte die in unseren Versuchen durch GdA reduzierte Induzierbarkeit von CD86 mit der Th2-Ausrichtung der Zytokinexpression nach Vorinkubation mit GdA in Zusammenhang stehen.

Interaktion zwischen GdA und DC-Sign

Die gemessene Persistenz von DC-Sign als Marker unreifer moDCs unter GdA-Einfluss lässt sich in die besprochenen Zusammenhänge sinnvoll einordnen: In vier aus sechs unabhängigen Experimenten zeigte sich unter dem Einfluss von GdA nach Reifeinduktion eine deutliche

DC-Sign-positive Population. Diese Daten lassen eine Interaktion zwischen DC-Sign und GdA vermuten.

DC-Sign interagiert mit Pathogenen, die eine gemeinsame Eigenart haben: Sie verursachen chronische Erkrankungen, bei denen ein verändertes Th1/Th2-Gleichgewicht im Wirt die Persistenz des Erregers begünstigt, so z.B. bei *Helicobacter pylori*, dem Hepatitis-C-Virus oder *Mycobacterium tuberculosis* (Geijtenbeek et al. 2004). Strukturell organisiert sich DC-Sign über Nanoclustering zu tetrameren Strukturen in der Zellmembran, welche multivalente Interaktionen mit Pathogenen ermöglichen, während der zytoplasmatische Teil von DC-Sign für die Internalisierung des Pathogens entscheidend ist (Manzo et al. 2012).

Die Immunregulation beeinflusst DC-Sign im Sinne einer Th1/Th2-Verschiebung, indem es die TLR-vermittelte Aktivierung von DCs moduliert (Van Kooyk et al. 2003). Im Zusammenspiel mit TLRs bestimmen CLRs die Ausrichtung der DCs und stellen in der Induktion der T-Zell-Toleranz eine effiziente Bindung zwischen DC und der naiven T-Zelle her (Steinman et al. 2002).

TLR binden PAMPs, DC-Sign hingegen Glycan-Ag, insbesondere hochgradig mannosehaltige N-Glycane wie z.B. gp120 des HIV (Feinberg et al. 2001) oder fukosylierte Blutgruppen-Ag (Lewis^{x,y,a, und b}) (Appelmelk et al. 2003). Die höchste Bindungsaffinität zu DC-Sign haben fukosylierte LacDiNac-N-Glycane (van Liempt et al. 2006).

Mit Ausnahme des Lewis^y finden sich alle Bindungspartner von DC-Sign auf Glycodelin. Neben Mannosestrukturen handelt es sich hier um die Glycane der Blutgruppen-Ag Lewis^x und deren LacDiNac-Analoga (Dell et al. 1995).

GdA ist das einzige bekannte Glykoprotein in Säugetieren mit fukosylierten LacDiNac-N-Glycanen. Auch für fukosylierte Lewis^x auf löslichen Eiantigenen (*soluble egg antigens SEAs*) des Parasiten *Schistosoma mansoni*, dem Erreger der Bilharziose, wurde eine hochaffine Bindung zu DC-Sign beschrieben (van Liempt et al. 2007).

Unsere Ergebnisse zur Wirkung von GdA auf MoDCs zeigen eine erstaunliche Ähnlichkeit zu den Effekten, welche bei humanen DCs unter *SEA*-Einfluss durch van Liempt beobachtet wurden:

Neben der Inhibierung der LPS-induzierten Ausreifung unreifer DCs wurde für *SEA* eine Reduktion der Zytokinproduktion von TNF- α , IL-6, IL-12 und von IL-10 nachgewiesen. Die Koinkubation unreifer DCs mit *SEA* und TLR-Liganden resultierte in einer abgeschwächten Th1-Antwort auf Phorbol-12-myristate-13-acetate (PAM) und einer Umpolung Richtung Th2 nach LPS-Stimulation. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der beschriebenen Effekte des *SEA* von den C-Typ Lektinen DC-Sign, Mannose-Rezeptor (MR) und dem Makrophagen-Galaktose-Typ Lektin (MGL) auf unreifen DCs, über welche ebenso die Internalisierung des *SEA* erfolgt.

Die in früheren Experimenten dokumentierte IL-10-Erhöhung durch *SEA* bei Mäusen (Kane et al. 2004) konnte hierbei nicht nachvollzogen werden, was auf Differenzen der, mit *SEA* interagierenden, DC-Rezeptoren in Mäusen und Menschen zurückgeführt wurde. Im Mausversuch beruht die durch *SEAs* ausgelöste Polarisation Richtung Th2 (Kullberg et al. 1992)

möglicherweise auf der Interaktion zwischen DC-Sign und Lewis^x, sowie mit TLR2 und TLR4 (van Die et al. 2003; Thomas et al. 2003).

Diese Zusammenhänge lassen trotz Differenzen im Aufbau der Experimente darauf schließen, dass van Liempt et al. nach *SEA*-Exposition in DCs ähnliche immunologische Reaktionen beobachtet haben wie wir in unseren Versuchen nach GdA-Inkubation. Dies lässt die Vermutung zu, dass GdA in moDCs die Ag-abhängige Expression von DC-Sign bewirkt.

Auch funktionelle Daten sprechen für ein Zusammenspiel zwischen GdA und DC-Sign:

Eine glykosilierungsabhängige Wechselwirkung zwischen den Lewis-Ag Lewis^a und Lewis^b auf Kolonkarzinomzellen und DC-Sign auf moDCs mündet in einer Unterdrückung der Ausreifung von moDCs und einer Zunahme der Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-10 (Nonaka et al. 2008). Als Wirkungskette wird die Bindung von Lewis durch DC-Sign und deren konsekutive Interferenz mit TLR-medierten Signalen postuliert.

Untergruppen von myeloiden DCs produzieren DC-Sign auf diverse Stimuli, einschließlich IL-4 und IL-10 (van Vliet et al. 2006; Relloso et al. 2002). Umgekehrt passt das im Kapitel 4.4.3 diskutierte Zytokinprofil, welches Gd in unseren Versuchen in moDCs induziert hat, gut zur Hypothese des Th2-Shifts durch eine Interaktion zwischen Lewis^x und DC-Sign.

In unseren Experimenten untersuchten wir die Bindung an DC-Sign und deren Signalweg aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von GdA nicht. In zukünftigen Experimenten könnte auf rekombinantes Glycodelin zurückgegriffen werden, allerdings müsste dabei aufgrund differierender Glykosilierung und Syialisierung die Übertragbarkeit der Daten überprüft werden.

4.4 Funktionelle Veränderungen Dendritischer Zellen durch Glycodelin A

4.4.1 Endozytose

Die Aufnahmekapazität von Dextran über den Mannose-Rezeptor liegt bei der eingesetzten Konzentration von 0,5 mg/ml FITC im Sättigungsbereich. Somit wurden in unseren Versuchen Veränderungen in der Makropinozytosefähigkeit wiedergespiegelt.

Die Ag-Aufnahme unreifer Dendritischer Zellen folgt in erster Linie den Prinzipien der rezeptorvermittelten Endozytose (Levine et al. 1992) sowie der Makropinozytose löslicher Ag mit einer Partikelgröße von 0,5-3 µm (Inaba et al. 1993). Der Aktivitätsgrad ist dabei von dem Reifegrad der DC abhängig und am höchsten in der unreifen moDC. Lymphoide DCs zeigen auch im unreifen Zustand keine hohe Endopinozytoserate (Banchereau et al. 2000).

Sallusto et al. fanden 1995 den Zusammenhang einer Unterdrückung von Makropinozytose und Mannoserezeptoren (MR) sowie der Vermehrung kostimulatorischer Moleküle nach Inkubation mit TNF-α, IL-1β, CD40-Ligand oder LPS und stellten diese Veränderungen in den Kontext des Reifungsprozesses (Sallusto et al. 1995). Die Korrelation wurde dahin gedeutet, dass die Zelle in

ihrer Ag-Aufnahme in dem Zustand eingefroren wird, in dem sie das kostimulatorische Signal zur Ausreifung empfängt und dadurch eine adäquate Momentaufnahme der relevanten Ag an die T-Zellen weitergibt, welche schließlich ihre Effektorfunktionen gezielt umsetzen.

Zudem gelang es der Arbeitsgruppe, den Mannoserezeptor als Hauptrezeptor für die Endozytose von FITC-Dextran zu identifizieren, welchem eine duale Rolle als Regulator der Glykoproteinhomöostase und Rezeptor der Pathogenerkennung zukommt (East et al. 2002).

Unreife DCs zeichnen sich durch eine vorübergehende Präsentation von Ag auf MHC-Molekülen bei fehlender Expression kostimulatorischer Moleküle aus. Semireife DCs, die Reifungssignale empfangen haben, jedoch ihre Endozytose nicht verringern, während kostimulatorische Moleküle hochreguliert werden, zeigen tolerogene Eigenschaften (Kammerer et al. 2008).

Bei der Vorbehandlung von DCs mit GdA in unseren Versuchen wurde zumindest ein Teil dieser endozytotischen und pinozytotischen Aktivität beibehalten, was wiederum auf einen halbreifen Zustand und damit auf regulatorische Fähigkeiten von Glycodelin A hindeutet.

4.4.2 Lymphozytoproliferative Kapazität

Die Induktion von mitotischer Aktivität in einer allogenen Lymphozytenpopulation durch DCs ist spätestens seit 1978 bekannt (Steinman et al. 1978) und in erster Linie ein Spiegel der Ag-Präsentation durch DCs und der direkten Interaktionen zwischen DC und Lymphozyt. Hierbei ist zu beachten, dass reife DCs eine größere Kapazität zur Induktion der Proliferation aufweisen als unreife Zellen (Cella et al. 1997).

Zudem muss die Wirkung weiterer proliferationsfördernder Faktoren wie z.B. IL-2 oder proliferationshemmender Zytokine wie IL-10 berücksichtigt werden (Caux et al. 1994a).

Ein Vorteil der Bestimmung des BrdU-Einbaus mittels ELISA gegenüber anderen Detektionsmethoden besteht darin, dass die Proliferation in einem sehr frühen Stadium gemessen wird, in dem die Zellteilung noch nicht vollständig abgeschlossen sein muss, wodurch der Test eine gute Sensitivität bietet.

In unseren Versuchen konnte unter der Inkubation mit GdA eine dosisabhängige Verminderung der lymphoproliferativen Kapazität gemessen werden. Diese Ergebnisse passen zu dem Bild, das Versuche von Kammerer ergaben: Dabei erreichten deziduale DCs aus der frühen Schwangerschaft nur ca. die Hälfte der stimulatorischen Kapazität auf die Lymphozyten-Proliferation, welche in DCs aus peripherem Blut gemessen wurde (Kammerer et al. 2000).

Die bei der MLR eingesetzten Lymphozyten umfassen in der Regel zu ca. 75-80% T-Lymphozyten und zu 20-25% B-Zellen und natürlichen Killerzellen, da in unseren Versuchen kein Verfahren zur T-Zell-Isolierung angewendet wurde. Eine sichere Zuordnung der durch DC induzierten Proliferation zu T-Lymphozyten lässt sich damit nicht führen. Der frühe Zeitpunkt der Inkubation mit BRDU könnte eine Akzentuierung der ermittelten proliferativen Reaktion auf NK-Zellen und γ/δ T-Zellen verursacht haben.

Aus anderen Experimenten unseres Labors wissen wir jedoch, dass auch nach einer Kokultur über 48h aus Dendritischen Zellen und Lymphozyten eine Aktivierung der T-Lymphozyten nachgewiesen werden kann (Roebe 2005).

Hinzuzufügen ist, dass nach experimentellen Regimen aus unserem Labor eine Isolierung der Responderzellen in der MLR, entsprechend der Differenziertheit der Fragestellung an das Experiment, nicht immer erforderlich ist und auch die mit entsprechenden Limitationen verbundenen Ergebnisse eine verwertbare Aussage zur Proliferationsinduktion in nicht adhärennten PBMCs ergeben (Schnurr et al. 2001; Scholz et al 2009a).

Die T-Zell-Aktivierung durch DCs benötigt zwei Signale: die Erkennung Ag-spezifischer MHCs durch spezifische TCR und die Bindung kostimulatorischer Moleküle, wie CD80 und CD86 von DCs an den CD28-Rezeptor der T-Zelle. Bindet die T-Zelle ein Ag mit hoher Avidität bei fehlender Kostimulation über CD28, so ist ihre Aktivierung durch eine verringerte Proliferation und suboptimale Effektorfunktionen geprägt (Kearney et al. 1994; Hernandez et al. 2001).

CD86 ist dabei entscheidend für die Amplifizierung der T-Zell-Antwort (Caux et al. 1994c), was in Bezug auf die in unseren Experimenten reduzierte Expression von CD86 nach GdA-Behandlung sehr interessant ist und mit der gemessenen Reduktion der lymphoproliferativen Kapazität in einen stimmigen Zusammenhang gebracht werden kann. Die Proliferationsinduktion in CD8⁺-Effektorzellen erfolgt mittels T-Helferzellen sowie durch DCs direkt und ohne Mittler (Inaba et al. 1987; McCoy et al. 1999).

DCs regen naive B-Zellen an und aktivieren Gedächtnis-B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung, wobei die Zytokine IL-12, IL-6 und INF- α beteiligt zu sein scheinen. Die B-Zell-Proliferation wird durch DCs, welche durch CD40-Liganden aktiviert sind, gesteigert und beschleunigt (Wan et al. 2008b).

Wie bereits in Kapitel 1.4 erörtert kommt den NKs an der feto-maternalen Grenzzone eine bedeutende Rolle zu, nicht zuletzt aufgrund ihrer besonderen Beziehung zu DCs. Reife DCs induzieren durch die Sezernierung von IL-15, IL-12, IL-18 und INF die NK-Zell-Proliferation und verändern deren Zytokinverhalten. Aktivierte NKs induzieren ihrerseits die DC-Reifung (Blois et al. 2008). Die mit GdA und Reifemarker inkubierten Dendritischen Zellen wurden nach dem Ernten und vor der für den Ansatz der MLR notwendigen Zellzählung ausgiebig gewaschen. Damit ist eine Verfälschung der Stimulationsergebnisse durch Reifestimuli oder GdA selbst nicht möglich.

Unsere Daten lassen vermuten, dass DCs ihre immunogene T-Zell-stimulatorische Kapazität nach der Begegnung mit GdA an der feto-maternalen Interphase reduzieren.

4.4.3 Zytokinsekretion

Zytokine bilden eine heterogene Gruppe löslicher Proteine, welche die Zellkommunikation medieren und sich in einem komplexen Netzwerk aus kreuzregulierenden, redundanten oder pleiotropen Funktionen gegenseitig bedingen (Callard et al. 1999).

Eine hohe Expression kostimulatorischer Moleküle reicht alleine nicht zum T-Zell-*Priming* aus (Pasare et al. 2004). Reife DCs sezernieren zudem Zytokine und regulieren damit die Ausrichtung der T-Helfer-Zellen (Wakkach et al. 2003; siehe Abb.1).

Ein seit Langem gültiges Paradigma klassifiziert Zytokine nach der T-Helferzelllinie, von der sie sezerniert werden und der damit verbundenen Bahnung der Immunreaktion in Th1- oder Th2-Zytokine. Th1-Zytokine vermitteln dabei in erster Linie die zelluläre, Th2-Zytokine dagegen die humorale Immunantwort (siehe Abb.1c).

Seit Wegmann wird eine gesunde Schwangerschaft als Th2-Phänomen betrachtet (Wegmann et al. 1993), obwohl dieses sehr hilfreiche Modell heute nicht mehr als allgemeingültiger Grundsatz in der Immunologie der Schwangerschaft verstanden werden kann und sich speziell für die Implantationsphase als unzutreffend erwiesen hat (siehe Kapitel 4.5).

Das Th2-Zytokin IL-10 ist für das Bestehen der Schwangerschaft nicht nur förderlich, sondern nahezu unabdingbar, was durch *in vivo* Studien am Mausmodell sehr gut nachvollzogen werden kann: So reduziert sich die Rate an Abstoßungen nach Injektion von aufgereinigtem IL-10 und wird durch die Applikation von IL-10-Ak erhöht (Chaouat et al. 1995). IL-10-Mangel-Mäuse sind fertil, zeigen aber ein verändertes intrauterines Wachstumsverhalten (White et al. 2004).

Im Laufe einer Schwangerschaft stößt IL-10 vielfältige Mechanismen an:

Es fördert die Reifung des Gelbkörpers und die Progesteronproduktion (Hashii et al. 1998) und limitiert die Invasivität des Trophoblasten bei der Implantation über eine Inhibierung der Matrix Metalloproteinasen MMP-9 (Pang et al. 2008). Auch GdA setzt an diesem Punkt an und scheint glykosilierungsabhängig über die Regulation von MMP-9 und MMP-2 in Trophoblasten direkt deren Invasion zu inhibieren (Lam et al. 2009).

Durch IL-10 wird die Expression von HLA-G induziert, welches die NK-Toxizität und die Antwort toxischer T-Lymphozyten gegen Trophoblasten bei Fehlen von MHCI-Moleküle inhibiert (Moreau et al. 1999). IL-10 schützt Erst-Trimester-Trophoblasten vor einer durch das Transmembranmolekül Fas mediierten Apoptose (Aschkenazi et al. 2002), senkt die COX-2-Expression und damit die PG-Synthese und hemmt eine frühzeitige Wehentätigkeit (Hanna et al. 2006). Um den Geburtstermin ist IL-10 erniedrigt, so dass MMP und PG wirken können.

An der Plazenta wird IL-10 von uNKs und durch den menschlichen Zytotrophoblasten sezerniert (Vigano et al. 2001). In DCs wird die IL-10-Sekretion durch TNF-Liganden und Interferon- β (INF- β) angestoßen (Kim et al. 2009; Fleetwood et al. 2009).

Mishan-Eisenberg publizierte bereits 1993, dass GdA direkt die T-Zell-Aktivität supprimiert und Th2-Zytokine wie IL-4 oder IL-13 induziert. IL-10 wurde allerdings in diesen Experimenten nicht betrachtet (Mishan-Eisenberg et al. 2004). Durch DCs sezerniertes IL-10 scheint für die Generierung von T_{reg}-Zellen entscheidend zu sein, indem es unreife DCs zu tolerogenen APCs konvertiert (Asseman et al. 1998; Steinbrink et al. 1997) und die terminale Ausreifung Dendritischer Zellen inhibiert (Blois et al. 2004).

Nicht zuletzt führt IL-10 zusammen mit GdA, PGE₂, und Östrogen zu einer Unterdrückung der Transkription von IL-12 sowie anderer schwangerschaftsgefährdender Th1-Zytokine und sichert dadurch ein Th2-Milieu (Kullberg et al. 1992; Sher et al. 1992).

IL-12 ist in seiner aktiven Form ein heterodimeres Zytokin IL-12p70, bestehend aus den Untereinheiten p35 und p40. Es wirkt wie andere Mitglieder seiner Familie, IL-23 und IL-27, als Th1-Zytokin und induziert die zytolytische Aktivität von T- und NK-Zellen, wodurch an der feto-maternalen Grenzfläche im Extremfall ein Abort induziert werden kann.

So wirkt auch im Mausmodell die Gabe von IL-12 während der frühen Gestationsphase abortinduzierend und geht mit einem veränderten Zytokinmilieu mit hochregulierten Spiegeln der Th1-Zytokine TNF- α und INF- γ einher (Knackstedt et al. 2003).

In DCs wird IL-12 durch TNF- α , IL-1 β oder IL-6 induziert (Schnurr et al. 2000; Berger et al. 2002). Bei einer genaueren Betrachtung der Dezidua konnte sowohl für die gesamte DC-Population als auch für den myeloiden Anteil demonstriert werden, dass die Anzahl an IL-12-sezernierenden Zellen geringer ist als in der DC-Population des peripheren Blutes.

Im Vergleich zu peripheren DCs ist bei dezidualen moDCs die Sekretion von IL-12 nach Immunstimulation (mit LPS oder CD40L) signifikant niedriger und das *Priming* naiver T-Zellen führt zu einem höheren Prozentsatz an Th2-Lymphozyten (Miyazaki et al. 2003).

Neben stimulierenden Botenstoffen wie TNF- α oder IL-1 β ist eine der tragenden Säulen der IL-12p70-Sekretion die Interaktion zwischen CD40 auf DCs und dem CD40-Liganden auf aktivierten T-Zellen (Moser et al. 2000; Koch et al. 1996).

Aus menschlicher Dezidua isolierte DCs zeigten bzgl. der Zytokinexpression ein ähnliches Reaktionsmuster auf Reifestimulation wie in unseren Versuchen nach Vorinkubation mit GdA (Bachy et al. 2008). Auch eine spontane Sekretion von Th2-Zytokinen einschließlich IL-10 wurde für mononukleäre Zellen im Schwangerschaftsverlauf berichtet (Gustafsson et al. 2006).

In unseren Experimenten ist die CD40-Bindung mglw. durch autologe *Bystander*-Zellen bereitgestellt worden, durch deren B-Zell-Anteil ebenfalls IL-12p70 sezerniert werden konnte. Diese IL-12-Sekretion wurde eventuell durch DCs unterdrückt (Moulin et al. 2000).

Die *Bystander*-Zellen, die zu ca. 24% in unseren moDC Kulturen vorhanden waren und während des Sortierungsprozesses über Adhärenz nicht eliminiert werden konnten, sind eine denkbare zusätzliche Quelle für IL-10 (Appel et al. 2004). Auch Makrophagen sind fähig, IL-10 zu sezernieren. Allerdings muss bei der dokumentierten CD14-Negativität und einer nahezu vollständigen Ausreifung zu moDCs nicht von *Bystander*-Makrophagen ausgegangen werden.

In Anbetracht der Reinheit der DC-Präparation stellen moDCs die wahrscheinlichste Quelle für IL-10 und IL-12 in unseren Experimenten dar. Andere Quellen können jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Da die Inkubationsbedingungen mit *Bystander*-Zellen in allen Versuchsansätzen gleich waren, ist durch diese Sekretionsquelle allerdings in erster Linie ein homogenes Hintergrundsignal zu erwarten.

Unter Punkt 4.1.2 wurde bereits die Frage nach der Apoptoseinduktion von GdA in moDCs diskutiert. Das von uns gemessene Sekretionsmuster für IL-10 spricht bei den eingesetzten GdA-Konzentrationen gegen eine Apoptoseinduktion.

In der erwähnten Studie von Tee et al. (Tee et al. 2008) wurde beobachtet, dass die TNF- α -Stimulation in Monozyten zu einer Aktivierung von NF- κ B führt und somit Monozyten vor der – von rekombinantem Gd induzierten – Apoptose bewahrt. Nach rGd-Inkubation war diese durch TNF- α induzierte Aktivierung von NF- κ B signifikant reduziert.

Der Promotor der IL-12-Gene besitzt eine Bindungsstelle für NF- κ B und wird unter dessen Kontrolle als Transkriptionsfaktor exprimiert (Murphy et al. 1995). Dieser Zusammenhang ist beachtenswert, vor allem im Hinblick auf den unbekannten intrazellulären Signalweg, der die IL-12-Sekretion mit der GdA-Vorinkubation verbindet. Das intrazelluläre Fragment von TNF- α löst in DCs die Transkription von IL-12 aus (Friedmann et al. 2006).

Die durch unsere Experimente abgebildeten Veränderungen der Zytokinsekretion in DCs unter GdA-Einfluss sind mit den bisherigen Forschungsergebnissen zur GdA-Wirkung auf die Zytokinsekretion von T-Zellen und zum Expressionsmuster von Zytokinen in dezydualen moDCs vereinbar. Über die Kausalkette der Gd-induzierten IL-10-Sekretion durch moDCs und der nachfolgend erleichterten Differenzierung zu T_{reg}-Zellen ist ein weiteres Puzzlestück im Bild der Th2-Induktion durch GdA und der Tolerogenese an der feto-maternalen Schnittstelle erkennbar.

4.5 Das Paradoxon der Implantationsphase

„Was der Forscher sucht, mag er als Wahrheit verklären; was er findet, ist jedoch eine Summe von Wahrheiten, deren jede eine frühere Wahrheit ersetzt hat, ohne diese damit zur Unwahrheit oder Lüge gemacht zu haben“ (Erwin Chargaff 1989).

Dieser Satz, mit dem Erwin Chargaff die wissenschaftliche „Annäherung an eine Wirklichkeit“ beschrieb, trifft wohl auch auf Wegmann zu, dem bereits 1993, als er das Th2-Paradigma der Schwangerschaft formulierte, bewusst war, dass ein entscheidender Abschnitt der Gravidität seiner Hypothese nicht folgt: die Implantation (Chaouat et al. 2004; Wegmann et al. 1993).

Bereits vier Jahre zuvor wurde festgestellt, dass ein leukozytärer Influx in den konzeptionsbereiten Uterus stattfindet (Noun et al. 1989) und wenig später wurde erkannt, dass dieser für eine erfolgreiche Einnistung der Blastozyste eine notwendige Bedingung darstellt und von inflammatorischen Zytokinen begleitet wird (Kachkache et al. 1991; Sanford et al. 1992). In Knockoutversuchen mit Mäusen konnten für die Blockierung von Rezeptoren der

Th1-Zytokine IL-1, IL-11 und für INF- γ Implantationsdefekte nachgewiesen werden (Simon et al. 1994; Bilinski et al. 1998; Ashkar et al. 2000).

Heute wird die Implantation allgemein als physiologischer inflammatorischer Prozess verstanden, der von Adhäsionmolekülen, Chemokinen, Enzymen wie Matrixmetalloproteasen und hauptsächlich von Th1-Zytokinen bestimmt wird (Miyazaki et al. 2003).

In dieses Bild fügt sich auch die bemerkenswerte Plastizität muriner Dendritischer Zellen in der Polarisierung des Zytokinmilieus. Diese zeigt sich an einer deutlichen Abnahme von IL-10-seziernden Zellen um den Gestationstag 5.5, deren intrazelluläre Spiegel an IL-10 im größten Teil der Schwangerschaft höher ist als der von IL-12 (Blois et al. 2004).

Dieser Phase folgend stellt sich unter dem Einfluss embryonaler Signale wie INF- τ ein Klima ein, in welchem IL-10 überwiegt, die Interaktion zwischen uterinen und fetalen Zellen bestimmt und die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft fördert (Chaouat et al. 1995; Martal et al. 1998). Immunologisch bedingte Sterilität könnte nach Chaouat kausal mit einer abnormal persistierenden Inflammation über die Adhäsionsphase hinaus verknüpft sein – einem Zeitpunkt, in welchem normalerweise ein zellulärer Reflux überwiegt und die meisten inflammatorischen Zytokine auf ihr ursprünglich niedriges Niveau zurückkehren (Chaouat et al. 2004). So auch IL-12, das in hohen Konzentrationen schwangerschaftsschädlich ist, jedoch in niedrigen Dosen unverzichtlich. In Mäusen erzeugen Mutationen im IL-12-Gen oder in der Signaltransduktion vaskuläre Pathologien an der uteroplazentaren Interphase (Croy et al. 1997). Das ist gut nachvollziehbar, wenn man in Betracht zieht, dass IL-12 neben der NK-Aktivierung eine Eigenschaft als Angiogenese-Inhibitor zugeschrieben wird (Voest et al. 1995).

Entscheidend für der Implantationsphase ist es also, die Th1-Antwort und ihre Zytokine im richtigen Maß zu halten, eine zu starke Aktivierung des Systems zu verhindern und den Prozess zeitlich und örtlich zu limitieren.

Zu der aktuellen These der Implantation als Th1-bestimmtes Geschehen scheinen einige Erkenntnisse zur Wirkungsweise und dem Sekretionsmuster von Glycodelin A im Widerspruch zu stehen. Schon 1993 sprach Li die Korrelation zwischen plazentarem Protein 14 in uterinen Flüssigkeiten und der Morphologie des Endometriums an und verband eine gute Detektierbarkeit von Gd in der Amnionflüssigkeit mit einer normalen histologischen Entwicklung des Endometriums in der Periimplantationsphase (Li et al. 1993a). Den Einfluss von Gd auf die Th-Ausrichtung allerdings beschreibt Mishan-Eisenberger als synergistisch zu IL-4. Hinzu kommt, dass aufgrund der wechselseitigen Kreuzregulationen unter Zytokinen auch leichte Einflüsse – wie durch Gd in der Desensibilisierung des TCR-Signalsystems in der frühen Aktivierungsphase von T-Zellen – in großen Ausschlägen in der Populationsdynamik und dem Umschwenken in eine Th2-Antwort münden können (Mishan-Eisenberg et al. 2004). Lee konnte eine Erhöhung des Th2-Anteils in peripheren T-Helfer-zellpopulationen nach GdA-Kontakt feststellen und vermuten eine Apoptoseinduktion durch GdA in Th1-Zellen (Lee et al. 2011).

In unseren Versuchen haben wir ein Sekretionsmuster für IL-10 und IL-12 gemessen, das den beschriebenen Th2-Shift nachvollziehen lässt.

Wie lässt es sich jedoch erklären, dass das Th2-fördernde Glycodelin in der Th1-lastigen Periimplantationsperiode so stark vertreten ist?

Grundsätzlich ergibt sich bei der Betrachtung der Wirkungsweise einzelner Zytokine stets das Problem, dass die Zytokine *in vivo* in unterschiedlicher und sogar kompensatorischer Weise wirken können, was *in vitro* nicht leicht zu erfassen ist. Auch hängt ihre Wirkungsweise nicht nur von der Quantität ihrer Expression ab, sondern auch von dem örtlichen und zeitlichen Expressionsmuster. Für IL-4 wurde der Zusammenhang zwischen Wirkung und Inkubationszeit in Kapitel 4.2 bereits diskutiert.

Knockout-Mäuse für Th2-Zytokine zeigen eine normale Schwangerschaftsentwicklung (Svensson 2001), was darauf hindeuten könnte, dass die funktionelle Rolle der betroffenen Zytokine von anderen verwandten Zytokinen übernommen wird (Billington 2003).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnten die nicht-polarisierenden Umstände bieten, welche Mishan-Eisenberg als Voraussetzung für den Th2-Shift durch Gd genannt hat und welche auch für unsere Versuche zutrafen. Polarisierende Faktoren sind allerdings in der Phase der Nidation der Eizelle in großer Zahl zu finden (siehe Abb. 3).

Da die Implantation als kontrolliertes inflammatorisches Geschehen verstanden wird und ihr Erfolg letztendlich von der Allogenerkennung und Entwicklung einer Th1-Antwort abhängt, kann postuliert werden, dass GdA während der frühen feto-maternalen immunologischen Beziehung Th1-Effektor-Antworten limitiert. Damit könnte es zur Vermeidung einer Th1-Exazerbation beitragen, ebenso wie zur Etablierung einer tolerogenen maternalen Immunlage, welche das Fundament für die weitere gesunde Entwicklung des Embryos und der Plazenta bildet.

4.6 Ausblick

4.6.1 Perspektiven in der Forschung

Während der vorliegenden Arbeit zur Beeinflussung Dendritischer Zellen durch GdA haben sich einige interessante Fragen ergeben, welche bisher nicht beantwortet sind:

CD200, ein spezielles Oberflächenmolekül auf Trophoblasten und dezidualen Zellen, wird beim Menschen am 8.-12. Schwangerschaftstag exprimiert (Clark et al. 2003). Die Triggerung unreifer DCs mit CD200-Rezeptor-Ak schlägt sich in der Induktion einer regulatorischen CD4⁺IL2RA⁺T-Zellpopulation mit einer erhöhten FOXP3 Expression nieder (Gorczynski et al. 2005). Eine Blockierung von CD200-R erhöht dagegen die Abstoßungsrate.

Vor dem Hintergrund ähnlicher Auswirkungen auf den Schwangerschaftsverlauf ist eine Kausalverknüpfung zwischen GdA und der CD200-Rezeptordichte auf DCs möglich.

Ähnlich verhält es sich mit der bereits erwähnten IDO (siehe Kapitel 1.4), die in der Plazenta neben dem Trophoblasten v.a. von DCs produziert wird und den semiallogenen Fetus vor Angriffen durch mütterliche T-Zellen schützt. Auch hier ist ein Zusammenhang der Sezernierungsdynamik mit dem Gd-Spiegel vorstellbar. Eine Korrelation zwischen der erhöhten IDO-Expression in LPS-stimulierten DCs nach Behandlung mit dem potentiellen GdA-Induktor hCG und ihrer reduzierten T-Zell-Stimulation wurde bereits hergestellt (Wan et al. 2008a).

Exosomen entstehen, wenn MHCII-reiche intrazelluläre Kompartimente mit der Plasmamembran verschmelzen. Dabei wird ein Teil der MHCII-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert, der Rest in Vesikeln als Exosomen freigesetzt. Diese exprimieren neben MHCI- und MHCII-Molekülen auch kostimulatorische Moleküle, Integrine und Immunglobuline (Schuurhuis et al. 2006). Freigesetzte Exosomen wirken immunregulatorisch und tolerogen (Karlsson et al. 2001) und könnten durch Ag-Austausch auch an der interzellulären Kommunikation beteiligt sein. Ob GdA die Exosomenfreisetzung aus DCs beeinflusst, ist bisher nicht untersucht.

In Ergänzung unseres experimentellen Settings wäre es interessant, die Bedeutung der Syialisierung von GdA in der Interaktion mit DCs – z.B. durch Verwendung von desyaliertem GdA – zu untersuchen.

Die Reversibilität der gemessenen GdA-Wirkung ist durch neutralisierende Ak experimentell erfassbar. Für GdO konnte in unserer Arbeitsgruppe die Reversibilität der Effekte auf DCs bereits nachgewiesen werden (Scholz et al. 2009a).

Unsere Ergebnisse bieten einen neuen Blickwinkel auf die Forschung zur Immunologie der fetomaternalen Interphase: Die beobachteten morphologischen Veränderungen von moDCs lassen die Vermutung zu, dass in einer spezifischen moDC-Untergruppe Wechselwirkungen zwischen DC-Sign und GdA bestehen, welche DC-Sign als einen potentiellen GdA-Rezeptor ins Spiel bringen. Weitere Forschung ist notwendig, um den Gd-Rezeptor auf DCs zu identifizieren und damit Ansatzpunkte für eine gezielte Immunmodulation durch das Glykoprotein zu finden.

4.6.2 Perspektiven in der Klinik

Will man die vielfältigen Funktionen des Glycodelins auf einen Nenner bringen, ergeben sich neben der Angiogenese und Zelldifferenzierung zwei Hauptfelder: die Immuno- bzw. Tolerogenese und seine Rolle in der Kontrazeption.

Die Immunsuppression ist ein zentrales Thema der Medizin, das bisher nur unvollkommen verstanden ist und Kernbereiche wie die Transplantationsmedizin, die Onkologie, Infektiologie, Autoimmunerkrankungen bzw. Allergologie und nicht zuletzt die Schwangerschafts- und Infertilitätsmedizin berührt. Die Therapiemöglichkeiten sind in diesen Disziplinen oft noch suboptimal, mit schweren Nebenwirkungen belastet und werden intensiv beforscht.

Im Folgenden soll kurz beleuchtet werden, wie die klinische Bedeutung des Glycodelins und seiner Wirkung auf Dendritische Zellen gestaltet ist bzw. sein könnte.

Reproduktionsmedizin

Uterine Rezeptivität ist ein Kernproblem der assistierten reproduktiven Technologien, wie der In-vitro-Fertilisation (IVF), denn die Implantation bleibt darin der hauptlimitierende Schritt. Die Erweiterung unseres Wissens über uterine Rezeptivität ist daher essentiell, um die Effizienz assistierter reproduktiver Verfahren zu verbessern und die Anzahl abgestoßener Embryonen zu vermindern.

Die dargelegte Rolle des Gds in der Schwangerschaft sowie die bemerkenswerte Assoziation abnormer GdA-Spiegel mit Schwangerschaftspathologien geben Grund zur Hoffnung auf eine therapeutische Relevanz für unerklärte Infertilität und Schwangerschaftskomplikationen, bei welchen eine insuffiziente immunologische Toleranz in die Kausalpathogenese involviert ist.

In der Fertilitätsmedizin wird der therapeutische Einsatz regulatorischer T-Zellen diskutiert (Guerin et al. 2009), welche u.a. durch tolerogene DCs aus naiven T-Zellen generiert werden können (Rutella et al. 2004). Die zugrundeliegenden Bedingungen der T_{reg}-Zell-Expansion am Schauplatz der Implantation sind noch nicht verstanden. Es ist gut vorstellbar, dass Gd, dessen Bedeutung in der Periimplantationsphase in Kapitel 1.4 besprochen wurde, über die Förderung tolerogener DCs zu dem T_{reg}-Zell-Peak im ersten Trimester beiträgt. Auch das durch GdA induzierte IDO ist in der Lage, direkt regulatorische T-Zellen zu generieren und wirkt inhibitorisch auf die T-Zell-Proliferation an der feto-maternalen Schnittfläche (Dong et al. 2008).

Uchida und Mitarbeiter stellen den Inhibitor der Histondeacetylase *Superoylanilide hydroxamic acid* in seiner Eigenschaft als GdA-Induktor, welcher die Differenzierung der endometrialen Drüsen anstößt und den ersten Schritt der Implantation fördert, als Ersatz für Progesteronderivate in der Infertilitätsbehandlung zur Diskussion (Uchida et al. 2007a).

Auch die Rückwirkung einer Infertilitätsbehandlung auf die endometriale Ausreifung in der Mittlutealen Phase ist in der aktuellen Forschung von großem Interesse:

Die ovarielle Stimulation während einer IVF hatte auf die endometrialen Reifemarker wie z.B. *Leukemia inhibitory factor* (LIF) oder Gd keinen Einfluss (van der Gaast et al. 2008).

In der Literatur wird Gd immer wieder als prädiktiver Parameter der endometrialen Rezeptivität und des Erfolges einer IVF diskutiert (Suzuki et al. 2000). Eine verringerte Gd-Expression konnte in Frauen mit wiederholten Spontanaborten nach IVF im Vergleich zu Frauen mit erfolgreicher IVF nachgewiesen werden (Bersinger et al. 2008). Bei wiederholten Spontanaborten ist ein reduzierter Gd-Spiegel mehrfach als Risikofaktor identifiziert worden. Erklärbar wäre dieser Zusammenhang auch durch eine verhinderte Leukozytenadhäsion an Trophoblasten durch GdA über Blockierung der E-Selektin-medierten Zelladhäsion.

Selektin-blockierende Effekte wurden auch bei β -HCG beobachtet, welches evtl. als GdA-Induktor wirkt und bei wiederholten Spontanaborten ebenfalls reduziert ist (Jeschke et al. 2010). Inwieweit ein direkter therapeutischer Einsatz von Gd in Zukunft von Nutzen sein kann,

muss in der aktuellen Forschung allerdings noch genauer untersucht werden (Toth et al. 2010). Derzeit stehen in der Therapie wiederholter ungeklärter Spontanaborte – neben Immunglobulinen und der Immunisierung mit väterlichen Leukozyten – andere Immunmodulatoren wie G-CSF und TNF- α -Blocker im Vordergrund (Scarpellini et al. 2009; Winger et al. 2008).

Das semiallogene Implantat Embryo erinnert in seinem Wachstum, der Invasivität und Immunregulation an das Verhalten tumörösen Gewebes. Auch sind grundlegende immunologische *Escape*-Mechanismen des Embryos in der Tumorummunologie wiederzufinden (Ridolfi et al. 2009), wodurch diese beiden Forschungsgebiete erheblich voneinander profitieren.

Onkologie

Das Verständnis der Entwicklung, Ausbreitung und Immunologie von Tumoren ist die Grundlage für die Entdeckung neuer Ansatzpunkte in deren Diagnose und Therapie.

In unserem Labor wurde GdO aus Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit Eierstockkrebs auf seine Wirkung auf DCs hin untersucht, wobei wir eine verminderte Ausreifung unter GdO im Sinne einer reduzierten Ag-Aufnahme und lymphoproliferativen Aktivität, sowie einer erhöhten IL-10-Sekretion feststellen konnten. Diese Effekte waren interessanterweise durch Gd-neutralisierende Ak reversibel. In unseren Augen könnten maligne transformierte Zellen ihre immunologische Umgebung modulieren, indem sie tolerogene Mechanismen der Plazentation nutzen und damit ihr Überleben in einem primär aggressiven, tumorfeindlichen Milieu verbessern (Scholz et al. 2009a). Im Ovarialkarzinom wurde eine Korrelation zwischen Gd-Expression und dem Differenzierungsgrad (*Grading*) bzw. Invasionsgrad (*Staging*) der Tumorzellen beschrieben, so dass Gd evtl. auch als Tumormarker zur Diskussion stehen wird (Tsviliana et al. 2010). Die Gd-Expression wurde auch als immunhistochemisch detektierbarer prädiktiver Marker für eine negative Prognose bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom vorgestellt. Im Serum war Gd bereits in gutartigen Pathologien des Ovars erhöht. Die Bedeutung einer glykosilierungsspezifischen Detektion von GdA und deren potentielle Rolle als Serummarker für das Ovarialkarzinom ist dabei noch nicht geklärt (Scholz et al. 2012).

Auch die Expression von Gd im Gewebe des Brustkarzinoms wurde untersucht und als Marker der Gewebedifferenzierung diskutiert (Scholz et al. 2009b). Hohe Gd-Spiegel sind in sporadischem Brustkrebs mit geringer Proliferationsrate und guter Differenzierung assoziiert, in familiärem Brustkrebs (nicht BRCA 1/2) sowie in invasiven lobulären und duktalem Karzinomen mit einem ungünstigeren Phänotyp und Metastasen (Hautala et al. 2010; Scholz et al. 2010).

Histondeacetylaseinhibitoren (HDACI) wurden bereits als potentieller Progesteronersatz in der Infertilitätstherapie besprochen. In der Onkologie finden sie als Induktoren des Zellzyklusarrestes und der Apoptose, aber auch der Zelldifferenzierung therapeutische Anwendung. Die Differenzierung wird in Zellen des Adenokarzinoms des Endometriums über eine Hochregulierung von Gd mediert. Allerdings wurde einhergehend damit auch eine Zunahme der

Migration maligner Zellen beobachtet, welche durch ein Ausschalten des Gd-Gens blockiert werden konnte.

Die Autoren vermuten, dass im Endometriumkarzinom ein Therapieversagen von HDACI über den Mediator Glycodelin auf eine erhöhte Invasivität maligner Zellen bei gleichzeitigem Ausbleiben seiner antiproliferativen und Differenzierungs-fördernden Effekte zurückgeführt werden kann (Uchida et al. 2007b).

Autoimmunerkrankungen und Allergologie

Wie in Kapitel 4.3 beschrieben wird der tolerogene, immunmodulierende Effekt von Gd durch den Helminthen *Schistosoma mansoni* über fukosylierte Karbohydratstrukturen nachgeahmt. Derartige *Escape*-Mechanismen von Parasiten werden intensiv beforscht und finden bereits Eingang in die Klinik, um ein übersteuerndes Immunsystem zu bremsen: Dabei werden entweder apathogene Wurmartarten wie der Schweinepeitschenwurm *Trichuris suis* dem Patienten direkt zugeführt, oder dessen immunmodulatorische Substrate wie das Eiantigen vom pathogenen Pärchenegel *Schistosoma*. Therapeutische Überlegungen beziehen sich in erster Linie auf Krankheiten des autoimmunen und allergischen Formenkreises.

Im Mausmodell wirken *SEA* von *Schistosoma mansoni* protektiv in einer ganzen Reihe von experimentellen Modellen von Th1- oder Th17-lastigen Autoimmunerkrankungen: bei Typ 1 Diabetes in nicht obesen diabetischen Mäusen (Zaccone et al. 2009), bei experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (Zheng et al. 2008), bei TNBS-induzierter Kolitis (Elliott et al. 2003) und bei der Kollagen-induzierten Arthritis (Osada and Kanazawa 2010).

Interessanterweise ergeben sich auch protektive Effekt bei Asthma (Amu et al. 2010) und systemischer Anaphylaxie (Mangan et al. 2004), welche ein Th2-Übergewicht aufweisen. Sollte sich unsere Vermutung als zutreffend erweisen, dass der Pärchenegel ähnliche Mechanismen und evtl. sogar die gleichen Rezeptoren auf DCs anspricht wie Gd, dann wäre eine therapeutische Immunmodulation durch Gd vorstellbar und die Forschung könnte auch in dieser Richtung Denkanstöße gewinnen.

5. Resümee

Das Paradoxon der Viviparität entsteht im Spannungsfeld zwischen der mütterlichen Toleranz und der Immunogenität eines sich implantierenden, primär invasiven semiallogenen Fremdkörpers: dem Fetus.

Die Entwicklung der immunologischen Nische an der Grenzfläche zwischen Fetus und Mutter verläuft geordnet und regelmäßig. Dadurch bietet sie ein ausgezeichnetes Forschungsfeld, um das Grundverständnis der Tolerogenese in Säugetieren zu erweitern und die Medizin in Kernbereichen wie der Onkologie und Immunologie weiterzuentwickeln.

Die Bedeutung von Glykopeptiden wie Galaktinen und Glycodelin für das diffizile Immunsystem der Plazenta ist gut belegt. Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals den Einfluss von Glycodelin A aus Fruchtwasser auf humane, Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen.

Diese Antigen-präsentierenden Zellen agieren als zentrale Schaltstelle zwischen der angeborenen, unspezifischen und der adaptiven, spezifischen Abwehr und sind in der Lage, immunologische Toleranz zu erzeugen. Unser *in vitro* Modell basiert auf der Annahme, dass menschliche, aus Monozyten generierte Dendritische Zellen ein ähnliches physiologisches Verhalten zeigen wie menschliche deziduale DCs, welche überwiegend einen myeloischen Ursprung aufweisen.

Um den Effekt von Glycodelin abzubilden, betrachteten wir experimentell die morphologischen und funktionellen Veränderungen in Dendritischen Zellen nach einer 48-stündigen Inkubation mit Glycodelin A.

MoDCs zeigten nach dem Kontakt mit GdA eine verminderte Induzierbarkeit der kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD86, welche die Ausreifung der Zellen anzeigen. Gleichzeitig reduzierte GdA in DCs die Kapazität, Antigene zu präsentieren, was sich in einer verringerten MHCII-Expression spiegelte.

Auffällig war dabei, dass das C-Typ Lektin DC-SIGN, ein charakteristischer Marker unreifer DCs, nach GdA-Inkubation signifikant erhöht war. DC-Sign wird bekanntlich auch durch eine Subpopulation unreifer DCs während der Dezidualisierung der Gebärmutter Schleimhaut stark exprimiert: Diese Zellen zeichnen sich durch eine hohe Ag-Bindungs- und -Aufnahmefähigkeit aus und induzieren sehr effizient die Proliferation naiver T-Zellen. Wegen ihres zeitlich exklusiven Auftretens im dezidualisierten Endometrium wird ihnen eine zentrale Rolle für die immunologische Beziehung zwischen Trophoblast und Dezidua zugesprochen.

Insgesamt ergab sich nach der Exposition zu Glycodelin ein halbreifer Phänotyp, der eine tolerogene Potenz der Dendritischen Zellen nahelegt.

Durch die Resultate unserer funktionellen Assays fanden wir diese Vermutung unterstützt: Unter GdA verringerte sich die Fähigkeit der moDCs, in Lymphozyten Proliferation zu induzieren.

Die Endozytosefähigkeit, ein Merkmal unreifer DCs, blieb selbst unter Reifeinduktion erhalten und das Profil der sezernierten Zytokine IL-12 und IL-10 verschob sich in Richtung des tolerogenen IL-10, wobei die immunogene IL-12-Sekretion nach GdA-Inkubation unterdrückt war.

Das Expressionsmuster von Oberflächenmarkern Dendritischer Zellen nach GdA-Kontakt deutet zusammen mit den gemessenen funktionellen Veränderungen auf eine Interaktion zwischen GdA und DC-Sign hin, wobei DC-Sign als potentieller Rezeptor für GdA zu diskutieren ist. Weitere Experimente sind nötig, um diese Interaktion besser zu verstehen und in den Zusammenhang maternaler Toleranz einzuordnen.

Unsere Ergebnisse bestätigen die Arbeitshypothese, dass humanes GdA aus Amnionflüssigkeit *in vitro* immunmodulatorisch auf humane, Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen wirkt und einen halbreifen, tolerogenen Zustand fördert.

Klinische Relevanz könnten diese Erkenntnisse in den Bereichen der Reproduktionsmedizin, der Onkologie und den Autoimmunerkrankungen bzw. der Allergologie gewinnen: das Verständnis der Immuno- bzw. Tolerogenese ist in diesen Disziplinen eines der wichtigsten Kernprobleme.

Die grundlegende Bedeutung von Glycodelin für das Bestehen einer Schwangerschaft wird an der Assoziation abnorm erniedrigter GdA-Spiegel mit wiederholten Spontanaborten deutlich. Der aktuell diskutierte therapeutische Einsatz regulatorischer FOXP3⁺-T-Zellen in der Fertilitätsmedizin könnte von dem Einsatz tolerogener DCs nach Glycodelin-Exposition zur Generierung dieser regulatorischen T-Zellen profitieren.

In der Onkologie wurde bisher vor allem in gynäkologischen Tumoren nach einem möglichen Einsatz von Glycodelin gesucht: Im Ovarialkarzinom wurde eine Korrelation zwischen Gd-Expression und dem Differenzierungs- bzw. Invasionsgrad der Tumorzellen beschrieben, so dass Gd evtl. als Tumormarker in Frage kommen könnte. Im Gewebe des Brustkarzinoms ist die Expression von Gd als Marker der Gewebedifferenzierung und eventuell als prognostischer Marker in der aktuellen Forschung von großem Interesse. Und auch im Endometriumkarzinom ist man dem Differenzierungs-, jedoch leider auch Invasions-förderndem Gd auf der Spur.

Der therapeutische Einsatz Dendritischer Zellen in Tumorerkrankungen wird seit 1995 intensiv beforscht, wobei DCs als Träger von Zielantigenen, sogenannten Vaccinen, des Tumors eingesetzt werden. Dabei sind tolerogene Mechanismen, wie sie durch Glycodelin induziert werden können, zu erkennen und zu vermeiden, da sie den Therapieerfolg gefährden würden.

Bei Autoimmunerkrankungen und in der Allergologie werden tolerogene Eigenschaften von Parasiten mittlerweile gezielt therapeutisch eingesetzt, so z.B. die Eiantigene des Pärchenegels, dem Erreger der Billharziose. Dabei werden über DC-Sign möglicherweise die gleichen Rezeptoren auf DCs angesprochen wie durch GdA selbst. Somit sind gezielte Immunmodulationen durch GdA bzw. GdA-exponierte DCs zu diskutieren und neue Therapieansätze denkbar.

6. Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

Aerts-Toegaert, C. and C. Heirman, "CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses," *Eur.J.Immunol.* 37 (3): 686-695 (2007).

Ahn, JS. and B. Agrawal, "IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells," *Int.Immunol.* 17 (10): 1337-1346 (2005).

Akbari, O. et al., "Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen," *Nat.Immunol.* 2 (8): 725-731 (2001).

Alok, A. et al., "Glycodelin A, an immunomodulatory protein in the endometrium, inhibits proliferation and induces apoptosis in monocytic cells," *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 41 (5): 1138-47 (2009).

Amu, S. et al., "Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model," *J.Allergy Clin.Immunol.* 125 (5): 1114-1124 (2010).

Appel, H. et al., "An elevated level of IL-10- and TGF-beta-secreting T cells, B cells and macrophages in the synovial membrane of patients with reactive arthritis compared to rheumatoid arthritis," *Clin.Rheumatol.* 23 (5): 435-440 (2004).

Appelmelk, BJ. et al., "Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells," *J.Immunol.* 170 (4): 1635-1639 (2003).

Aschkenazi, S. et al., "Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells," *Biol.Reprod.* 66 (6): 1853-1861 (2002).

Ashkar, AA. et al., "Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy," *J.Exp.Med.* 192 (2): 259-270 (2000).

Asseman, C. and F. Powrie, "Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells," *Gut* 42 (2): 157-158 (1998).

Austin, CR., "Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg," *Aust.J.Sci.Res.(B)* 4 (4): 581-596 (1951).

Bachy, V. et al., "Altered dendritic cell function in normal pregnancy," *J.Reprod.Immunol.* 78 (1): 11-21 (2008).

Banchereau, J. et al., "Immunobiology of dendritic cells," *Annu.Rev.Immunol.* 18: 767-811 (2000).

Banchereau, J. et Palucka, "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer," *Nat.Rev.Immunol.* 5 (4): 296-306 (2005).

Barrientos, G. et al., "Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future," *Hum.Reprod.Update* 20 (2): 175-93 (2014).

Bartoli, P., DI. Gibson, and R. A. Bray, "Prosorhynchoides gracilescens from Lophius piscatorius L. is a species complex: a redescription of this species from the western Mediterranean and the description of P. borealis n. sp. from the northern North-East Atlantic," *Syst.Parasitol.* 63 (3): 203-221 (2006).

Bender, A. et al., "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood," *J.Immunol.Methods* 196 (2): 121-135 (1996).

Berger, TG. et al., "Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories," *J.Immunol.Methods* 268 (2): 131-140 (2002).

Bergh, PA. and D. Navot, "The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation," *Fertil.Steril.* 58 (3): 537-542 (1992).

Bersinger, NA. et al., "Gene expression in cultured endometrium from women with different outcomes following IVF," *Mol.Hum.Reprod.* 14 (8): 475-484 (2008).

Bersinger, NA. et al., "Serum glycodelin pattern during the menstrual cycle in healthy young women," *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* 88 (11): 1215-1221 (2009).

Bhatt, K. et al., "B7 costimulation is critical for host control of chronic Mycobacterium tuberculosis infection," *J.Immunol.* 182 (6): 3793-3800 (2009).

Bianchi, DW. et al., "Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (2): 705-708 (1996).

Bilinski, P. et al., "Maternal IL-11/Ralpha function is required for normal decidua and fetoplacental development in mice," *Genes. Dev.* 12 (14): 2234-2243 (1998).

Billington, WD., "The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar," *J.Reprod.Immunol.* 60 (1): 1-11 (2003).

Bischof, P. and A. Campana, "A model for implantation of the human blastocyst and early placentation," *Hum.Reprod.Update.* 2 (3): 262-270 (1996).

Blackburn, DG., "Reconstructing the Evolution of Viviparity and Placentation," *J.Theor.Biol.* 192 (2): 183-190 (1998).

Blois, SM. et al., "Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy," *Biol.Reprod.* 70 (4): 1018-1023 (2004).

Blois, SM. et al., "Dendritic cells: key to fetal tolerance?," *Biol.Reprod.* 77 (4): 590-598 (2007a).

Blois, SM. et al., "A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance," *Nat.Med.* 13 (12): 1450-1457 (2007b).

Blois, SM. et al., "Interaction between dendritic cells and natural killer cells during pregnancy in mice," *J.Mol.Med.* 86 (7): 837-852 (2008).

Bohn, H. et al., "New soluble placental tissue proteins: their isolation, characterization, localization and quantification," *Placenta Suppl.* 4: 67-81 (1982).

Bolton, AE. et al., "The relationship of placental protein 14 (PP14) in the mother and fetus to specific products of the human placenta," *Placenta* 6 (1): 1-4 (1985).

Bolton, AE. et al., "Identification of placental protein 14 as an immunosuppressive factor in human reproduction," *Lancet* 1 (8533): 593-595 (1987).

Borrelío, F. et al., "B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation," *Immunity* 6 (3): 303-313 (1997).

Boyum, A., "Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents," *Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl.* 97: 31-50 (1968).

Braun, D. et al., "Semimature stage: a checkpoint in a dendritic cell maturation program that allows for functional reversion after signal-regulatory protein- α ligation and maturation signals," *J.Immunol.* 177 (12): 8550-8559 (2006).

Breloer, M. et al., "CD83 regulates Lymphocyte maturation, activation and homeostasis," *Trends Immunol.* 29 (4): 186-194 (2008).

Brett, F. et al., "The distribution of immunoreactive interferon- γ -containing cells in normal human tissues," *Immunology* 77 (4): 515-519 (1992).

Brown, MS and Goldstein, JL, "Receptor mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system," *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76 (7): 3330-3337 (1979).

Bruckner, M. et al., "Distinct modulation of chemokine expression patterns in human monocyte derived dendritic cells by prostaglandin E₂," *Cell. Immunol.* 276 (1-2): 52-58 (2012).

Burke, SD. et al., "Uterine NK cells, spiral artery modification and the regulation of blood pressure during mouse pregnancy," *Am.J.Reprod.Immunol.* 63 (6): 472-481 (2010).

Callard, R. et al., "Cytokines, chaos, and complexity," *Immunity* 11 (5): 507-513 (1999).

Carosella, ED. et al., "Beyond the increasin complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule," *Blood* 111 (10): 4862-4870 (2008).

Carter, AM., "Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses," *Physiol.Rev.* 92 (4): 1543-1576 (2012).

Caux, C. et al., "Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells," *Int.Immunol.* 6 (8): 1177-1185 (1994a).

Caux, C. et al., "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking," *J.Exp.Med.* 180 (4): 1263-1272 (1994b).

Caux, C. et al., "B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells," *J.Exp.Med.* 180 (5): 1841-1847 (1994c).

Cella, M. et al., "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells," *Curr.Opin.Immunol.* 9 (1): 10-16 (1997).

Chaouat, G. et al., "IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- τ ," *J.Immunol.* 154 (9): 4261-4268 (1995).

Chaouat, G. et al., "Th1/Th2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the Th1/Th2 paradigm," *Int.Arch.Allergy Immunol.* 134 (2): 93-119 (2004).

Chargaff, E., "Abscheu vor der Weltgeschichte," *Klett-Cotta-Verlag, Stuttgart* ISBN 3-608-93531-2, S.10 (1989).

Chiu, PC. et al., "Binding of zona binding inhibitory factor-1 (ZIF-1) from human follicular fluid on spermatozoa," *J.Biol.Chem.* 278 (15): 13570-13577 (2003).

Chiu, PC. et al., "Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa," *J.Biol.Chem.* 280 (27): 25580-25589 (2005).

Chiu, PC. et al., "Cumulus oophorus-associated glycodelin-C displaces sperm-bound glycodelin-A and -F and stimulates spermatozoa-zona pellucida binding," *J.Biol.Chem.* 282 (8): 5378-5388 (2007).

Clark, GF. et al., "A role for glycoconjugates in human development: the human feto-embryonic defence system hypothesis," *Hum.Reprod.* 11 (3): 467-473 (1996).

Clark, D. A. et al., "Placental trophoblast from successful human pregnancies expresses the tolerance signaling molecule, CD200 (OX-2)," *Am.J.Reprod.Immunol.* 50 (3): 187-195 (2003).

Conti, L. and S. Gessani, "GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances," *Immunobiology* 213 (9-10): 859-870 (2008).

Croy, B. A. et al., "Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy," *J.Reprod.Immunol.* 35 (2): 111-133 (1997).

Cumberbatch and Kimber, "Dermal tumour necrosis factor alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration," *Immunology* 75 (2): 257-263 (1992).

D'Andrea, A. et al., "Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production," *J.Exp.Med.* 181 (2): 537-546 (1995).

Dealtry, GB. Et al., "The Th2 cytokine environment of the placenta," *Int.Arch.Allergy Immunol.* 123 (2): 107-119 (2000).

Dell, A. et al., "Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodelin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities," *J.Biol.Chem.* 270 (41): 24116-24126 (1995).

Della, Chiesa M. et al., "The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors," *Eur.J.Immunol.* 33 (6): 1657-1666 (2003).

Dinarello, CA, "Interleukin-1," *Ref. Infect Dis.* 6 (1): 51-95 (1984).

Dinarello, CA, "A clinical perspective of IL-1 β as gatekeeper of inflammation," *Europ. J. Immunol.* 41 (5): 1203-1217 (2011).

Dong, M. et al., "The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules- a proteomic analysis," *Cell Physiol Biochem.* 21 (5-6): 463-472 (2008).

Elliott, DE. et al., "Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis," *Am.J.Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 284 (3): 385-G391 (2003).

- Fearnley, DB. et al.**, "Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy," *Blood* 89 (10): 3708-3716 (1997).
- Feinberg, H. et al.**, "Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR," *Science* 294 (5549): 2163-2166 (2001).
- Ferrand, J. et al.**, "Recognition of Extracellular Bacteria by NLRs and Its Role in the Development of Adaptive Immunity," *Front Immunol.* (4): 344 (2013).
- Figdor, CG. et al.**, "C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells," *Nat.Rev.Immunol.* 2 (2): 77-84 (2002).
- Fischer, I. et al.**, "The role of galectin-1 in trophoblast differentiation and signal transduction," *J. Reprod. Immunol.* 90 (1): 35-40 (2011).
- Fitzgerald, JS. et al.**, "Knocking off the suppressors of cytokine signaling (SOCS): their roles in mammalian pregnancy," *J. Reprod. Immunol.* 83 (1-2): 117-123 (2009).
- Fitzgerald, JS. et al.**, "Governing the invasive trophoblast: current aspects on intra-andextracellular regulation," *Am. J. Reprod. Immunol.* 63 (6): 492-505 (2010).
- Fleetwood, AJ. et al.**, "GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling," *J.Leukoc.Biol.* 86 (2): 411-421 (2009).
- Flower, DR.**, "The lipocalin protein family: structure and function," *Biochem.J.* 318 (Pt 1): 1-14 (1996).
- Freeman, GJ. et al.**, "Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7," *J.Exp.Med.* 174 (3): 625-631 (1991).
- Friedmann, E. et al.**, "SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production," *Nat.Cell Biol.* 8 (8): 843-848 (2006).
- Gallucci, S. and P. Matzinger**, "Danger signals: SOS to the immune system," *Curr.Opin.Immunol.* 13 (1): 114-119 (2001).
- Gardner, L. and A. Moffett**, "Dendritic cells in the human decidua," *Biol.Reprod.* 69 (4): 1438-1446 (2003).
- Geijtenbeek, TB. et al.**, "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 receptor present in placenta that infects T cells in trans-a review," *Placenta* 22 Suppl. A: S19-S23 (2001).
- Geijtenbeek, TB. et al.**, "Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells," *Annu.Rev.Immunol.* 22: 33-54 (2004).
- Gerosa, F. et al.**, "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells," *J.Exp.Med.* 195 (3): 327-333 (2002).
- Ginhoux, F. et al.**, "Langerhans cells arise from monocytes in vivo," *Nat.Immunol.* 7 (3): 265-273 (2006).
- Gorczynski, RM. et al.**, "Augmented Induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R," *Transplantation* 79 (9): 1180-1183 (2005).

- Griebel, CP. et al.**, "Management of spontaneous abortion," *Am.Fam.Physician* 72 (7): 1243-1250 (2005).
- Groux, H. et al.**, "Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells," *Semin.Immunol.* 16 (2): 99-106 (2004).
- Guerin, LR. et al.**, "Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?," *Hum.Reprod.Update.* 15 (5): 517-35 (2009).
- Gustafsson, C. et al.**, "Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha," *J.Reprod.Immunol.* 71 (1): 41-56 (2006).
- Hanna, N. et al.**, "Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of cyclo- oxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta," *Am.J.Reprod.Immunol.* 55 (1): 19-27 (2006).
- Hart, DN.**, "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response," *Blood* 90 (9): 3245-3287 (1997).
- Hashii, K. et al.**, "Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and non-pregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation," *Hum.Reprod.* 13 (10): 2738-2744 (1998).
- Hathcock, KS. et al.**, "Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function," *J.Exp.Med.* 180 (2): 631-640 (1994).
- Hausermann, HM. et al.**, "Regulation of the glycosylated beta-lactoglobulin homolog, glycodelin [placental protein 14:(PP14)] in the baboon (*Papio anubis*) uterus," *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83 (4): 1226-1233 (1998).
- Hautala, LC. et al.**, "Glycodelin expression associates with differential tumour phenotype and outcome in sporadic and familial non-BRCA1/2 breast cancer patients," *Breast Cancer Res.Treat.* 128 (1): 85-95 (2010).
- Hawiger, D. et al.**, "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo," *J.Exp.Med.* 194 (6): 769-779 (2001).
- Hernandez, J. et al.**, "Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen," *J.Exp.Med.* 194 (6): 707-717 (2001).
- Hiby, SE. et al.**, "Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success," *J.Exp.Med.* 200 (8): 957-965 (2004).
- Hill, JA. et al.**, "T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion," *JAMA* 273 (24): 1933-1936 (1995).
- Horne, CH et al.**, "Localization of alpha-uterine protein in human endometrium," *J.Reprod.Fertil.* 65 (2): 447-450 (1982).
- Horowitz, IR. et al.**, "Increased glycodelin levels in gynecological malignancies," *Int.J.Gynecol.Cancer* 11 (3): 173-179 (2001).
- Hudic, I. and Z. Fatusic**, "Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and Th(1)/Th(2) cytokine in women with threatened spontaneous abortion," *J.Perinat.Med.* 73 (4): 338-342 (2009).

Huhtala, ML. et al., "Amino acid sequence homology between human placental protein 14 and beta-lactoglobulins from various species," *Endocrinology* 120 (6): 2620-2622 (1987).

Inaba, K. et al., "Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells," *J.Exp.Med.* 166 (1): 182-194 (1987).

Inaba, K. et al., "Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo," *J.Exp.Med.* 178 (2): 479-488 (1993).

Janeway, CA., Jr., "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self," *Immunol.Today* 13 (1): 11-16 (1992).

Jansen, JH. et al., "Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4," *J.Exp.Med.* 170 (2): 577-582 (1989).

Jayachandran, R. et al., "Analysis of the role of oligosaccharides in the apoptotic activity of glycodelin A," *J.Biol.Chem.* 279 (10): 8585-8591 (2004).

Jeschke, U. et al., "Glycodelin and amniotic fluid transferrin as inhibitors of E-selectin-mediated cell adhesion," *Histochem.Cell.Biol.* 119 (5): 345-354 (2003).

Jeschke, U. et al., "Stimulation of hCG protein and mRNA in first trimester villous cytotrophoblast cells in vitro by glycodelin A," *J.Perinat.Med.* 33 (3): 212-218 (2005a).

Jeschke, U. et al., "[Stimulation of HCG, estrogen and progesterone production in isolated trophoblast cells by glycodelin A or its N-glycans]," *Z.Geburtshilfe Neonatol.* 209 (2): 59-64 (2005b).

Jeschke, U. et al., "Glycodelin A and differentiation of first trimester trophoblast cells in vitro," *Arch.Gynecol.Obstet.* 272 (2): 151-159 (2005c).

Jeschke, U. et al., "Immunohistochemistry, glycosylation and immunosuppression of glycodelin in human ovarian cancer," *Histochem.Cell.Biol.* 131 (2): 283-295 (2009).

Jeschke, U. et al., "Glycoprotein and carbohydrate binding protein expression in the placenta in early pregnancy loss," *J.Reprod.Immunol.* 85 (1): 99-105 (2010).

Jiang, W. et al., "The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing," *Nature* 375 (6527): 151-155 (1995).

Jin, L. P. et al., "Adoptive transfer of paternal antigen-hyporesponsive T cells facilitates a Th2 bias in peripheral lymphocytes and at materno-fetal interface in murine abortion-prone matings," *Am.J.Reprod.Immunol.* 56 (4): 258-266 (2006).

Jonuleit, H. et al., "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of otent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions," *Eur.J. Immunol.* 27 (12): 3135-3142 (1997).

Jonuleit, H. et al., "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells," *J.Exp.Med.* 192 (9): 1213-1222 (2000).

Joshi, SG., "Progestin-dependent human endometrial protein: a marker for monitoring human endometrial function," *Adv.Exp.Med.Biol.* 230: 167-186 (1987).

Julkunen, M. et al., "Detection and localization of placental protein 14-like protein in human seminal plasma and in the male genital tract," *Arch.Androl.* 12 Suppl: 59-67 (1984).

Julkunen, M. et al., "Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy," *Br.J.Obstet.Gynaecol.* 92 (11): 1145-1151 (1985).

Julkunen, M., "Human decidua synthesizes placental protein 14 (PP14) in vitro," *Acta Endocrinol.(Copenh)* 112 (2): 271-277 (1986).

Julkunen, M. et al., "Secretory endometrium synthesizes placental protein 14," *Endocrinology* 118 (5): 1782-1786 (1986).

Julkunen, M. et al., "Complete amino acid sequence of human placental protein 14: a progesterone-regulated uterine protein homologous to beta-lactoglobulins," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85 (23): 8845-8849 (1988).

Kachkache, M. et al., "Hormonal and local factors control the immunohistochemical distribution of immunocytes in the rat uterus before conceptus implantation: effects of ovariectomy, fallopian tube section, and injection," *Biol.Reprod.* 45 (6): 860-868 (1991).

Kalinski, P. et al., "IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E₂, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells," *J.Immunol.* 159 (1): 28-35 (1997).

Kalinski, P. et al., "IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells," *J.Immunol.* 165 (4): 1877-1881 (2000).

Kalinski, P. et al., "Prostaglandin E₂ is a selective inducer of interleukin-12 p40 production and inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer," *Blood* 97 (11): 3466-3469 (2001).

Kalkunte, S. et al., "Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface," *J.immunol.* 182 (7): 4085-92 (2009).

Kamarainen, M. et al., "HinfI polymorphism in the human progesterone associated endometrial protein (PAEP) gene," *Nucleic Acids Res.* 19 (18): 5092 (1991).

Kamarainen, M. et al., "Progesterone-associated endometrial protein-a constitutive marker of human erythroid precursors," *Blood* 84 (2): 467-473 (1994).

Kamarainen, M. et al., "Normal human ovary and ovarian tumors express glycodelin, a glycoprotein with immunosuppressive and contraceptive properties," *Am.J.Pathol.* 148 (5): 1435-1443 (1996).

Kamarainen, M. et al., "Expression of glycodelin in MCF-7 breast cancer cells induces differentiation into organized acinar epithelium," *Lab. Invest.* 77 (6): 565-573 (1997).

Kammerer, U. et al., "Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells," *Am.J.Pathol.* 157 (1): 159-169 (2000).

Kammerer, U. et al., "Role of dendritic cells in the regulation of maternal immune responses to the fetus during mammalian gestation," *Immunol.Invest.* 37 (5): 499-533 (2008).

Kane, CM. et al., "Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation," *J.Immunol.* 173 (12): 7454-7461 (2004).

Karande, AA. et al., "Mechanism of the immunomodulatory activity of glycodelin," *Indian J.Physiol. Pharmacol.* 49 (3): 271-283 (2005).

- Karlsson, M. et al.**, ""Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells," *Eur.J.Immunol.* 31 (10): 2892-2900 (2001).
- Kearney, ER. et al.**, "Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo," *Immunity.* 1 (4): 327-339 (1994).
- Kerrigan, AM. and G. D. Brown**, "C-type lectins and phagocytosis," *Immunobiology* 214 (7): 562-575 (2009).
- Kim, KS. et al.**, "Functional implication of BAFF synthesis and release in gangliosides-stimulated microglia," *J.Leukoc.Biol.* 86 (2): 349-359 (2009).
- Kindret et al.**, "Lymphocytes which differentiate in an allogeneic thymus. II. Evidence for both central and peripheral mechanisms in tolerance to donor strain tissues," *Eur.J.Immunol.* 7 (7): 437-42 (1977).
- Knackstedt, MK. et al.**, "Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion," *Am.J.Reprod.Immunol.* 49 (4): 210-220 (2003).
- Koch, F. et al.**, "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10," *J.Exp.Med.* 184 (2): 741-746 (1996).
- Kontopidis, G., C. Holt, and L. Sawyer**, "Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function," *J.Dairy Sci.* 87 (4): 785-796 (2004).
- Koopman, LA. et al.**, "Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential," *J.Exp.Med.* 198 (8): 1201-1212 (2003).
- Krause,P. et al.**, "Prostaglandin E₂ enhances T cell proliferation by inducing the co-stimulatory molecules OX40L, CD70 and 4-1BBL on dendritic cells," *Blood*, 113 (11): 2451-2460 (2009).
- Krey, G. et al.**, "In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency, affecting implantation and early placental development in mice," *J.Mol.Med.* 86 (9): 999-1011 (2008).
- Kuchroo, VK. et al.**, "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy," *Cell* 80 (5): 707-718 (1995).
- Kullberg, MC. et al.**, "Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen," *J.Immunol.* 148 (10): 3264-3270 (1992).
- Kundig, TM. et al.**, "Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells," *Immunity.* 5 (1): 41-52 (1996).
- Kurts, C. et al.**, "Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells," *J.Exp.Med.* 186 (2): 239-245 (1997).
- Kvale, EO. et al.**, "Plasmacytoid DCs regulate recall responses by rapid induction of IL-10 in memory T cells," *Blood* 109 (8): 3369-3376 (2007).
- Lam, KK. et al.**, "Glycodelin-A as a modulator of trophoblast invasion," *Hum.Reprod.* 24 (9): 2093-2103 (2009).
- Lam, KK. et al.**, "Glycodelin-A Protein interacts with Sigle-6-Protein to suppress Trophoblast Invasiveness by Down-regulating Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)/c-Jun Signaling Pathway," *J.Biol.Chem.* 286 (43): 37118-37127 (2011).

Lan, Z. et al., "Induction of kidney allograft tolerance by soluble CD83 associated prevalence of tolerogenic dendritic cells and indolamin 2,3-dioxygenase," *Tranplantation* 90 (12): 1286-93 (2010).

Lang, EE. and G. Venkatraman, "Glycodelin gene expression in human peripheral white blood cells," *Ir.J.Med.Sci.* 176 (2): 101-104 (2007).

Larsen, CP. et al., "Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells," *J.Immunol.* 152 (11): 5208-5219 (1994).

Laskarin, G. et al., "Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells," *Am.J.Reprod.Immunol.* 58 (3): 255-267 (2007).

Lechmann, M. et al., "The CD83 reporter mouse elucidates the activity of the CD83 promoter in B, T, and dendritic cell populations in vivo," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105 (33): 11887-11892 (2008).

Lee, JJ. et al., "The role of PGE₂ in the differentiation of dendritic cells: How do dendritic cells influence T-cell polarisation and chemokine receptor expression?," *Stemm. Cells.* 20 (5): 448-59 (2005).

Lee, CL. et al., "Glycodelin-A modulates cytokine production of peripheral blood natural killer cells," *Fertil.Steril.* 94 (2): 769-771 (2010).

Lee, CL. et al., "Differential actions of glycodelin-A on Th-1 and Th-2 cells: a paracrine mechanism that could produce the Th-2 dominant environment during pregnancy," *Hum.Reprod.* 6 (3): 517-526 (2011).

Lee, CL. et al., "Glycodelin-A stimulates Interleukin-6 Secretion from human monocytes and macrophages through I-selectin and extracellular signal-regulated kinase pathway," *J. Biol. Chem.* 287 (44): 36999-37009 (2012).

Lenschow, DJ. et al., "Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90 (23): 11054-11058 (1993).

Levine, TP. and BM. Chain, "Endocytosis by antigen presenting cells: dendritic cells are as endocytically active as other antigen presenting cells," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89 (17): 8342-8346 (1992).

Li, TC. et al., "The correlation of placental protein 14 concentrations in uterine flushing and endometrial morphology in the peri-implantation period," *Hum.Reprod.* 8 (11): 1923-1927 (1993a).

Li, TC. et al., "Concentration of endometrial protein PP14 in uterine flushings throughout the menstrual cycle in normal, fertile women," *Br.J.Obstet.Gynaecol.* 100 (5): 460-464 (1993b).

Lin, H. et al., "Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface," *J.Immunol.* 151 (9): 4562-4573 (1993).

Liu, K. and M. Nussenzweig, "Origin and development of dendritic cells," *Immunol.Rev.* 234 (1): 45-54 (2010).

Luft, T. et al., "IL-1 β enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation," *J.Immunol.* 168 (2): 713-22 (2002).

- Lutz, MB. and G. Schuler**, "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?," *Trends Immunol.* 23 (9): 445-449 (2002).
- Macagno, A. et al.**, "Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation," *Trends Immunol.* 28 (5): 227-233 (2007).
- MacPhee, IA. et al.**, "CD80(B7.1) and CD86(B7.2) do not have distinct roles in setting the Th1/Th2 balance in autoimmunity in rats," *Scand.J.Immunol.* 54 (5): 486-494 (2001).
- Mangan, NE. et al.**, "Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells," *J.Immunol.* 173 (10): 6346-6356 (2004).
- Manzo, C. et al.**, "The neck region of the C-type lectin DC-Sign regulates its surface spatiotemporal organisation and virus-binding capacity on antigen presenting cells," *J.Biol.Chem.* 287 (46): 38946-38955 (2012).
- Marshall, JD. et al.**, "Priming with IL-4 and IL-13 during HIV-1 infection restores in vitro IL-12 production by mononuclear cells of HIV-infected patients," *J.Immunol.* 159 (11): 5705-5714 (1997).
- Martal, JL. et al.**, "IFN-tau: a novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal and cross-species therapeutic potentialities," *Biochimie* 80 (8-9): 755-777 (1998).
- Matzinger, P.**, "Tolerance, danger, and the extended family," *Annu.Rev.Immunol.* 12: 991-1045 (1994).
- Matzinger, P.**, "The danger model: a renewed sense of self," *Science* 296 (5566): 301-305 (2002).
- Matzinger, P.**, "Friendly and dangerous signals: is the tissue in control?," *Nat.Immunol.* 8 (1): 11-13 (2007).
- McCoy, KD. et al.**, "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulate dendritic cell-induced activation and cytotoxicity of CD8(+) T cells independently of CD4(+) T cell help," *J.Exp.Med.* 189 (7): 1157-1162 (1999).
- Medawar, PB.**, "Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates," *Symp.Soc.Exp.Biol.* 7:320-338 (1953).
- Medzhitov, R. et al.**, "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity," *Nature* 388 (6640): 394-397 (1997).
- Mellman, I. and RM. Steinman**, "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines," *Cell* 106 (3): 255-258 (2001).
- Miller, RE. et al.**, "A receptor for the lipocalin placental protein 14 on human monocytes," *FEBS Lett.* 436 (3): 455-460 (1998).
- Mishan-Eisenberg, G. et al.**, "Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein 14," *J.Immunol.* 173 (9): 5524-5530 (2004).
- Miyazaki, S. et al.**, "Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua," *J.Leukoc.Biol.* 74 (4): 514-522 (2003).
- Moffett-King, A.**, "Natural killer cells and pregnancy," *Nat.Rev.Immunol.* 2 (9): 656-663 (2002).

- Moffett, A. et al.**, "Immunology of placentation in eutherian mammals," *Nat.Rev.Immunol.* 6 (8): 584-594 (2006).
- Moreau, P. et al.**, "IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes," *Int.Immunol.* 11 (5): 803-811 (1999).
- Morris, HR. et al.**, "Gender-specific glycosylation of human glycodelin affects its contraceptive activity," *J.Biol.Chem.* 271 (50): 32159-32167 (1996).
- Morrow, DM. et al.**, "Hematopoietic placental protein 14. An immunosuppressive factor in cells of the megakaryocytic lineage," *Am.J.Pathol.* 145 (6): 1485-1495 (1994).
- Moser, M. and KM. Murphy**, "Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development," *Nat.Immunol.* 1 (3): 199-205 (2000).
- Moulin, V. et al.**, "B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation," *J.Exp.Med.* 192 (4): 475-482 (2000).
- Mukhopadhyay, D. et al.**, "Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification," *J.Biol.Chem.* 279 (10): 8577-8584 (2004).
- Munn, DH. et al.**, "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism," *Science* 281 (5380): 1191-1193 (1998).
- Munn, DH. et al.**, "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase," *Science* 297 (5588): 1867-1870 (2002).
- Murphy, TL. et al.**, "Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site," *Mol.Cell Biol.* 15 (10): 5258-5267 (1995).
- Muth, S. et al.**, "Release of dendritic cells from cognate Cd4 T-cell recognition results in impaired peripheral tolerance and fatal cytotoxic T-cell mediated autoimmunity," *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (23): 9059-64 (2012).
- Nijland, R. et al.**, "Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-Inflammatory therapies," *Mar. Drugs* 12 (7): 4260-4273 (2014).
- Nishikawa, K. et al.**, "Accumulation of CD16-CD56+ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua," *Int.Immunol.* 3 (8): 743-750 (1991).
- Nonaka, M. et al.**, "Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells," *J.Immunol.* 180 (5): 3347-3356 (2008).
- Noun, A. et al.**, "Cells bearing granulocyte-macrophage and T lymphocyte antigens in the rat uterus before and during ovum implantation," *Clin.Exp.Immunol.* 78 (3): 494-498 (1989).
- Obermajer, N. et al.**, "Positive feedback between PGE₂ and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells towards stable myeloid-derived suppressor cells," *Blood* 118 (20): 5498-5505 (2011).
- Oehninger, S. et al.**, "Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida," *Fertil.Steril.* 63 (2): 377-383 (1995).

Ohta, K. et al., "Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth," *Mol.Hum.Reprod.* 14 (1): 17-22 (2008).

Okamoto, N. et al., "Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity," *Am.J.Reprod.Immunol.* 26 (4): 137-142 (1991).

Oksenberg, JR. et al., "Antigen-presenting cells in human decidual tissue," *Am.J.Reprod.Immunol.Microbiol.* 11 (3): 82-88 (1986).

Osada, Y. and T. Kanazawa, "Parasitic helminths: new weapons against immunological disorders," *J.Biomed.Biotechnol.* doi (2010).

Ozawa, H. et al., " Interleukin 1- β and granulocyte-macrophage colony stimulating factor mediate Langerhans cell maturation differently," *J.Invest. Dermatol.* 106 (3): 441-445 (1996).

Pala, A. et al., "Rapid purification and properties of human glycodelin (endometrial alpha2-globulin)," *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* 704 (1-2): 25-34 (1997).

Pang, ZJ. et al., "Interleukin-10 may participate in regulating trophoblast invasion in human placenta throughout gestation," *Am.J.Reprod.Immunol.* 60 (1): 19-25 (2008).

Pasare, C. and R. Medzhitov, "Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation," *Immunity.* 21 (5): 733-741 (2004).

Piccioli, D. et al., "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells," *J.Exp.Med.* 195 (3): 335-341 (2002).

Pockley, AG. et al., "Suppression of in vitro lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by placental protein 14," *J.Reprod.Immunol.* 13 (1): 31-39 (1988).

Pockley, AG. and AE. Bolton, "Placental protein 14 (PP14) inhibits the synthesis of interleukin-2 and the release of soluble interleukin-2 receptors from phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes," *Clin.Exp.Immunol.* 77 (2): 252-256 (1989).

Poornima, BL. and AA. Karande, "Differential sialylation regulates the apoptotic activity of glycodelin A," *FEBS Lett.* 581 (22): 4366-4370 (2007).

Pradeu, T. and ED. Carosella, "On the definition of a criterion of immunogenicity," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103 (47): 17858-17861 (2006).

Prechtel, AT et al., "CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to diminished T cell stimulation," *J.Immunol.* 178 (9): 5454-5464 (2007).

Rachmilewitz, J. et al., "A rheostatic mechanism for T-cell inhibition based on elevation of activation thresholds," *Blood* 98 (13): 3727-3732 (2001).

Rachmilewitz, J. et al., "Negative regulation of T cell activation by placental protein 14 is mediated by the tyrosine phosphatase receptor CD45," *J.Biol.Chem.* 278 (16): 14059-14065 (2003).

Raff, RA. and HR. Mahler, "The symbiont that never was: an inquiry into the evolutionary origin of the mitochondrion," *Symp.Soc.Exp.Biol.* (29): 41-92 (1975).

Relloso, M. et al., "DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents," *J.Immunol.* 168 (6): 2634-2643 (2002).

- Ridolfi, L. et al.**, "Human embryo immune escape mechanisms rediscovered by the tumor," *Immunobiology* 214 (1): 61-76 (2009).
- Riittinen, L. et al.**, "Purification and characterization of endometrial protein PP14 from mid-trimester amniotic fluid," *Clin.Chim.Acta* 184 (1): 19-29 (1989a).
- Riittinen, L. et al.**, "Time-resolved immunofluorometric assay for placental protein 14," *Clin.Chim.Acta* 183 (2): 115-123 (1989b).
- Rissoan, MC. et al.**, "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation," *Science* 283 (5405): 1183-1186 (1999).
- Ritter, U. et al.**, "Analysis of the maturation process of dendritic cells deficient for TNF and lymphotoxin-alpha reveals an essential role for TNF," *J.Leukoc.Biol.* 74 (2): 216-222 (2003).
- Roebe, J.**, "Einfluss der Aktivierung Dendritischer Zellen auf die Immunantwort in vitro," *Dissertationsschrift*, http://edoc.ub.uni-muenchen.de/4516/1/Roebe_Julian_N.pdf (2005).
- Romani, N. et al.**, "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood," *J.Exp.Med.* 180 (1): 83-93 (1994).
- Rutanen, EM. et al.**, "Progesterone-associated proteins PP12 and PP14 in the human endometrium," *J.Steroid Biochem.* 27 (1-3): 25-31 (1987).
- Rutella, S. and RM. Lemoli**, "Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications," *Immunol.Lett.* 94 (1-2): 11-26 (2004).
- Rutella, S. et al.**, "Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age," *Blood* 108 (5): 1435-1440 (2006).
- Sallusto, F. and A. Lanzavechia**, "Efficient presentation of soluble antigen by cultured dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleucin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α ," *J.Exp.Med.* 179 (4): 1109-1119 (1994).
- Sallusto, F. et al.**, "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products," *J.Exp.Med.* 182 (2): 389-400 (1995).
- Sanford, TR. et al.**, "Expression of colony-stimulating factors and inflammatory cytokines in the uterus of CD1 mice during days 1 to 3 of pregnancy," *J.Reprod.Fertil.* 94 (1): 213-220 (1992).
- Scarpellini, F. and M. Sbracia**, "Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial," *Hum.Reprod.* 24 (11): 2703-2708 (2009).
- Schnurr, M. et al.**, "Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells," *J.Immunol.* 165 (8): 4704-4709 (2000).
- Schnurr, M. et al.**, "Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells," *Cancer Res.* 62 (8): 2347-2352 (2002).
- Scholz, C. et al.**, "Distribution and maturity of dendritic cells in diseases of insufficient placentation," *Am.J.Reprod.Immunol.* 60 (3): 238-245 (2008).

- Scholz, C. et al.**, "Ovarian cancer-derived glycodelin impairs in vitro dendritic cell maturation," *J.Immunother.* 32 (5): 492-497 (2009a).
- Scholz, C. et al.**, "Immunohistochemical expression of glycodelin in breast cancer correlates with estrogen-receptor alpha and progesterone-receptor A positivity," *Histol.Histopathol.* 24 (4): 467-471 (2009b).
- Scholz, C. et al.**, "Glycodelin expression in correlation to grading, nodal involvement and steroid receptor expression in human breast cancer patients," *Anticancer Res.* 30 (5): 1599-1603 (2010).
- Scholz, C. et al.**, "Glycodelin is a prognostic marker to predict poor outcome in advanced stage ovarian cancer patients," *BMC Res.Notes* 5 (1): 551. (2012).
- Schuler, G. and RM. Steinman**, "Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro," *J.Exp.Med.* 161 (3): 526-546 (1985).
- Schurr, M. et al.**, "Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an *in vitro* model for the assessment of tumor vaccines," *Cancer Res.* 61 (17): 6445-50 (2001).
- Schuurhuis, DH.** "Ins and outs of dendritic cells," *Int.Arch.Allergy Immunol.* 140 (1): 53-72 (2006).
- Seavey, MM. and TR. Mosmann**, "Immunoregulation of fetal and anti-paternal immune responses," *Immunol.Res.* 40 (2): 97-113 (2008).
- Seong, SY. and P. Matzinger**, "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses," *Nat.Rev.Immunol.* 4 (6): 469-478 (2004).
- Seppala, M. et al.**, "Structural studies, localization in tissue and clinical aspects of human endometrial proteins," *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 36: 127-141 (1988).
- Seppala, M. et al.**, "Glycodelins," *Trends Endocrinol.Metab.* 12 (3): 111-117 (2001).
- Seppala, M. et al.**, "Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation," *Endocr.Rev.* 23 (4): 401-430 (2002).
- Seppala, M. et al.**, "Glycosylation related actions of glycodelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations," *Hum.Reprod.Update.* 13 (3): 275-287 (2007).
- Sher, A. and RL. Coffman**, "Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines," *Annu.Rev.Immunol.* 10: 385-409 (1992).
- Simon, C. et al.**, "Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist," *Endocrinology* 134 (2): 521-528 (1994).
- Soni, C. and AA. Karande**, "Glycodelin A suppresses the cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes," *Mol.Immunol.* 47 (15): 2458-66 (2010).
- Steinbrink, K. et al.**, "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells," *J.Immunol.* 159 (10): 4772-4780 (1997).
- Steinman, RM. and ZA. Cohn**, "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice," *J.exp.med.* 137 (5): 1142-62 (1973).

Steinman, RM. and MD. Witmer, "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75 (10): 5132-5136 (1978).

Steinman, RM., "The dendritic cell system and its role in immunogenicity," *Annu.Rev.Immunol.* 9: 271-296 (1991).

Steinman, RM., "Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation," *Mt.Sinai J.Med.* 68 (3): 160-166 (2001).

Steinman, RM., "Some interfaces of dendritic cell biology," *APMIS* 111 (7-8): 675-697 (2003).

Steinman, RM. et al., "Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance," *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 987: 15-25 (2003).

Steinman, RM. et al., "Tolerogenic dendritic cells," *Annu.Rev.Immunol.* 21: 685-711 (2003).

Sundarraaj, S., C. Soni, and A. A. Karande, "Glycodelin A triggers T cell apoptosis through a novel calcium-independent galactose-binding lectin activity," *Mol.Immunol.* 46 (16): 3411-3419 (2009).

Suzuki, Y. et al., "Clinical applications of serum placental protein 14 (PP14) measurement in the IVF-ET cycle," *J.Obstet.Gynaecol.Res.* 26 (4): 295-302 (2000).

Svensson, L., Arvola M. et al., "The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice," *J.Reprod.Immunol.* 51 (1): 3-7 (2001).

Sykes, L. et al., "The Th1:Th2 Dichotomy of Pregnancy and Preterm Labor," *Mediators Inflamm.* 967629 ; doi: 10.1155/2012/967629 (2012).

Szabo, A. et al., "Collaboration of Toll-like and RIG-I-like receptors in human dendritic cells: trIGgering antiviral innate immune responses," *Am.J-Clin-Immunol.* 2 (3): 195-207 (2013).

Tafari, A. et al., "T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy," *Science* 270 (5236): 630-633 (1995).

Taylor, RN. et al., "Promegestone (R5020) and mifepristone (RU486) both function as progestational agonists of human glycodelin gene expression in isolated human epithelial cells," *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 83 (11): 4006-4012 (1998).

Tee, MK. et al., "Natural and recombinant human glycodelin activate a proapoptotic gene cascade in monocyte cells," *J.Leukoc.Biol.* 83 (4): 843-852 (2008).

Tirado-Gonzales, I. et al., "Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy," *Mol.Hum.Reprod.* 19 (1): 43-53 (2013).

Thomas, IJ. et al., "CD86 has sustained costimulatory effects on CD8 T cells," *J.Immunol.* 179 (9): 5936-5946 (2007).

Thomas, PG. et al., "Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism," *J.Immunol.* 171 (11): 5837-5841 (2003).

Toth, B. et al., "Glycodelin protein and mRNA is downregulated in human first trimester abortion and partially upregulated in mole pregnancy," *J.Histochem.Cytochem.* 56 (5): 477-485 (2008).

- Toth, B. et al.**, "Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment," *J.Reprod.Immunol.* 85 (1): 25-32 (2010).
- Tse, JY. et al.**, "The synthesis and fate of glycodelin in human ovary during folliculogenesis," *Mol.Hum.Reprod.* 8 (2): 142-148 (2002).
- Tsviliana, A. et al.**, "Determination of glycodelin-A expression correlated to grading and staging in ovarian carcinoma tissue," *Anticancer Res.* 30 (5): 1637-1640 (2010).
- Uchida, H. et al.**, "Histone deacetylase inhibitor-induced glycodelin enhances the initial step of implantation," *Hum.Reprod.* 22 (10): 2615-2622 (2007a).
- Uchida, H. et al.**, "Histone deacetylase inhibitors stimulate cell migration in human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin," *Endocrinology* 148 (2): 896-902 (2007b).
- Vaisse, C. et al.**, "Human placental protein 14 gene: sequence and characterization of a short duplication," *DNA Cell Biol.* 9 (6): 401-413 (1990).
- Van Cong, N. et al.**, "The human placental protein 14 (PP14) gene is localized on chromosome 9q34," *Hum.Genet.* 86 (5): 515-518 (1991).
- van der Gaast, MH. et al.**, "Impact of ovarian stimulation on mid-luteal endometrial tissue and secretion markers of receptivity," *Reprod.Biomed.Online.* 17 (4): 553-563 (2008).
- Van Kooyk, Y. and TB.** Geijtenbeek, "DC-SIGN: escape mechanism for pathogens," *Nat.Rev.Immunol.* 3 (9): 697-709 (2003).
- van Liempt, E. et al.**, "Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans," *FEBS Lett.* 580 (26): 6123-6131 (2006).
- van Liempt, E. et al.**, "Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation," *Mol.Immunol.* 44 (10): 2605-2615 (2007).
- van Vliet, SJ. et al.**, "Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets," *Immunobiology* 211 (6-8): 577-585 (2006).
- van, Die, I et al.**, "The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for Schistosoma mansoni egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x," *Glycobiology* 13 (6): 471-478 (2003).
- Vigano, P. et al.**, "Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon-gamma," *Mol.Hum.Reprod.* 7 (10): 971-977 (2001).
- Voest, EE. et al.**, "Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12," *J.Natl.Cancer Inst.* 87 (8): 581-586 (1995).
- von Rango, U.**, "Fetal tolerance in human pregnancy - a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion," *Immunol.Lett.* 115 (1): 21-32 (2008).
- Wakkach, A. et al.**, "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo," *Immunity.* 18 (5): 605-617 (2003).
- Wan, H. et al.**, "Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype," *J.Leukoc.Biol.* 83 (4): 894-901 (2008a).

Wan, S. et al., "Direct B cell stimulation by dendritic cells in a mouse model of lupus," *Arthritis Rheum.* 58 (6): 1741-1750 (2008b).

Wegmann, TG. et al., "Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?," *Immunol.Today* 14 (7): 353-356 (1993).

White, CA. et al., "Effect of interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice," *Biol.Reprod.* 70 (1): 123-131 (2004).

Wilson, NS. et al., "Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature," *Blood* 102 (6): 2187-2194 (2003).

Winger, EE. and J. L. Reed, "Treatment with tumor necrosis factor inhibitors and intravenous immunoglobulin improves live birth rates in women with recurrent spontaneous abortion," *Am.J.Reprod.Immunol.* 60 (1): 8-16 (2008).

Yamazaki, S. et al., "Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells," *J.Exp.Med.* 198 (2): 235-247 (2003).

Yaniv, E. et al., "Placental protein 14 regulates selective B cell responses," *Cell. Immunol.* 222 (2): 156-163 (2003).

Yeung, WS. et al., "Roles of glycodelin in modulating sperm function," *Mol.Cell. Endocrinol.* 250 (1-2): 149-156 (2006).

Zaccane, P. et al., "Schistosoma mansoni egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice," *Eur.J.Immunol.* 39 (4): 1098-1107 (2009).

Zarnani, AH. et al., "Microenvironment of the feto-maternal interface protects the semiallogenic fetus through its immunomodulatory activity on dendritic cells," *Fertil.Steril.* 90 (3): 781-788 (2008).

Zhou, LJ. Et al., "Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily," *J.Immunol.* 154 (8): 3821-3835 (1995).

Zhou, LJ. et al., "CD14⁺ blood monocytes can differentiate in functionally mature CD83⁺ dendritic cells," *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93 (6): 2588-2692 (1996).

6.2 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Einheiten wurden mit dem international gebräuchlichen SI-System abgekürzt. Englische Begriffe werden kursiv geschrieben.

Seitenzahl der Erstbeschreibung in Klammern.

Abb.	(S.03)	Abbildung
APC	(S.05)	Antigen-präsentierende Zelle
Ag	(S.03)	Antigen
Ak	(S.05)	Antikörper
Asn	(S.12)	Asparagin
BCIP	(S.29)	5-Bromo 4-Chloro 3-Indoxyl Phosphat
BD	(S.20)	Becton Dickinson
BrdU	(S.37)	5`-Bromo-2`-deoxy-Uridin
CD	(S.35)	<i>Cluster of differentiation</i>
CLR	(S.06)	<i>C-type lectin-receptor</i>
kDa	(S.12)	Kilodalton (1Kilo der atomaren Masseneinheit, 1/12 der Masse ¹² C)
DAMP	(S.05)	<i>damage associated molecular pattern</i>
DC	(S.05)	Dendritische Zelle
DC-Sign	(S.09)	dendritic cellspecific ICAM-3 grabbing non-integrin
DEAE	(S.25)	Diethylaminoethan
ELISA	(S.38)	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	(S.33)	<i>Fluorescence-activated cell scanning</i>
FPLC	(S.24)	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FCS	(S.22)	Fetales Kälberserum
FITC	(S.35)	Fluorescein-Isocyanat
Gd	(S.12)	Glycodelin
GM-CSF	(S.17)	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HLA	(S.09)	humanes Leukozytenantigen
HDACI	(S.72)	Histondeacetylaseinhibitor
HPLC	(S.24)	<i>High performance liquid chromatography</i>
IDO	(S.09)	Indoleamine-2,3-dioxygenase
Ig	(S.05)	Immunglobuline
IFN	(S.07)	Interferon
IL	(S.07)	Interleukin
Le	(S.13)	Lewis
LH	(S.15)	Luteotropes Hormon

LK	(S.05)	Lymphknoten
LPS	(S.23)	Lipopolysaccharid
moDC	(S.19)	Monozyten-abgeleitete Dendritische Zelle
MFI	(S.46)	Mittlere Fluoreszenzintensität
MG	(S.12)	Molekulargewicht
MGM	(S.42)	Molekulargewichtsmarker
MHC	(S.05)	<i>Major histocompatibility complex</i>
MLR	(S.37)	Mixed lymphocyte reaction (gemischte Lymphozytenreaktion)
MMP	(S.17)	Matrix Metalloproteinasen
MR	(S.61)	Mannoserezeptor
NBT	(S.29)	Nitro-Blau-Tertrazolium
NK	(S.09)	Natürliche Killerzelle
PAMP	(S.05)	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMCs	(S.29)	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes <i>Peripher blood mononuclear cells</i>
PBS	(S.22)	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	(S.35)	Phycoerithrin
PerCP	(S.36)	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PG	(S.10)	Prostaglandin
PH	(S.20)	PH-Wert, pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii
PMT	(S.33)	<i>Photomultiplier</i>
PVDF	(S.28)	Polivinylen
Rez.	(S.06)	Rezeptoren
RT	(S.37)	Raumtemperatur
SDS	(S.28)	Natriumdodecylsulfat
SEA	(S.61)	<i>soluble egg antigen</i>
S.E.M.	(S.46)	<i>standard error of median</i>
Th-Zelle	(S.05)	T-Helfer-Zelle
TLR	(S.06)	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	(S.07)	Tumor-Nekrose-Faktor
T _{reg}	(S.08)	T-Regulator-Zelle
TB	(S.03)	Trophoblast
TCR	(S.05)	T-Zellrezeptor
uNK	(S.09)	uterine natürliche Killerzellen

6.3 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1a: Reif Zustände Dendritischer Zellen	07
Abb. 1b: Morphologie der DC im Ausreifungsprozess	07
Abb. 1c: Priming naiver T-Zellen	07
Abb. 2a: Die immunologische Synapse	08
Abb. 2b: Dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen im Gleichgewicht	08
Abb. 3: Immunologisches Milieu an der feto-maternalen Interphase	11
Abb. 4: Molekularstruktur des Glycodelins	13
Abb. 5: Glycodelin im Befruchtungsvorgang	14
Abb. 6: Sekretionsmuster von Glycodelin	15
Abb. 7: Chromatographie	25
Abb. 8: ABC-Färbung im Dot-Blot	26
Abb. 9: Photometrie	27
Abb. 10: Prinzip der Elektrophorese	28
Abb. 11: Ficoll-Dichtezentrifugation	31
Abb. 12: Generierung Dendritischer Zellen	32
Abb. 13: Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie	34
Abb. 14: Fluoreszenzspektrum	35
Abb. 15: Dinoflagellat	36
Abb. 16: Blaualgen	36
Abb. 17: Endozytose im FITC-Dextran-Versuch	37
Abb. 18: Antikörpergebundenes enzymatisches Immunadsorptionsverfahren (ELISA)	38
Abb. 19: Chromatogramm der hydrophoben Interaktions-Chromatographie an Resource Phe	40
Abb. 20: Dot-Blot nach der 1.Chromatographie an einer DEAE-Sephrose-CL-6B-Säule	41
Abb. 21: Dot-Blot nach der 2.Chromatographie mit Octyl-Sephrose-CL-4B-Säule	41
Abb. 22: Identifikation im Westernblot	42
Abb. 23: Standardkurve der Bradford-Proteinbestimmung	43
Abb. 24: DCs nach 6-tägiger Inkubation mit IL-4 und GM-CSF	44
Abb. 25: Exemplarischer Dot-Blot	45
Abb. 26: Expression von Reifemarkern und DC-Sign auf moDCs	46
Abb. 27: Expression von Reifemarkern und DC-Sign im Histogramm	47
Abb. 28: Endozytotische Aktivität	49
Abb. 29: Lymphoproliferative Kapazität	52
Abb. 30: IL-10-dominantes Muster ausgereifter moDCs unter GdA	53
 Tabelle 1: Glykosilierungsformen des Glycodelins und ihr Vorkommen	 18

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich sämtlichen Spendern danken, die uns selbstlos ihr Blut oder ihre Fruchtwasser überlassen haben. Sie haben die Grundsubstanz dieser Arbeit gestellt.

Prof. Dr. U. Jeschke danke ich für die freundliche Aufnahme und Inobhutnahme in seinem Labor und für die geduldige Einweisung in die Techniken der Proteinaufreinigung.

Prof. Dr. C. Scholz möchte ich für die unterstützende Aufmerksamkeit danken, mit der er meine ersten Gehversuche im Labor begleitet hat.

Christina Kuhn, Susi Kunze und Sandra Schulze danke ich für ihre erfahrenen Hände, mit denen sie mir in ihrer freundlichen Art über die alltäglichen Stolpersteine des Laborlebens geholfen haben.

Prof. Dr. S. Endres und seinen Mitarbeitern aus der Abteilung der Klinischen Pharmakologie der LMU im Klinikum Innenstadt danke ich für den Zugang in sein Labor und die Benutzung seiner Geräte.

Fabrizio Fornari danke ich für seine entgegenkommende und geduldige IT-Beratung.

Anton Winkler, Anna Dürr und Jan Glückert danke ich für ihre konzentrierte Hinwendung zum Detail beim Lesen dieser Arbeit.

Brendan Osberg danke ich für den freundlichen Zugang zu Artikeln und Fachliteratur.

Meiner Familie möchte ich aus ganzem Herzen danken. Sie stand mir während der Zeit meiner Doktorarbeit stets stützend und liebevoll zur Seite.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit möchte ich mich bei der Friedrich Bauer Stiftung bedanken.

8. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen als Poster vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

2006: Brunnhuber,R., Rampf,E., Jeschke,U., Scholz,C., Friese,K.,
"Glycodelin A: Einfluss auf Dendritische Zellen und die Adaptive Immunantwort,"
56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in Berlin.

Prof. Dr. C. Scholz wurde für Ergebnisse dieser Arbeit und unserer Arbeitsgruppe ausgezeichnet:

2007: New Investigator Award im Bereich Basic Science der European Society of Reproductive Immunology für die Erforschung des Einflusses des immunmodulatorischen Glykopeptids Glycodelin auf Dendritische Zellen;

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und dieser Arbeit wurden als Originalarbeiten in folgenden internationalen Fachzeitschriften und als Dissertationsschrift an der LMU veröffentlicht:

2008: Scholz, C., Toth, B., Brunnhuber, R., Rampf, E., Weissenbacher, T., Santoso, L., Friese, K., Jeschke, U., "Glycodelin A induces a tolerogenic phenotype in monocyte-derived dendritic cells in vitro," Am.J.Reprod.Immunol. 60 (6): 501-512.

2009: Scholz, C., Rampf, E., Toth, B., Brunnhuber, R., Weissenbacher, T., Santoso, L., Friese, K., Jeschke, U., "Ovarian cancer-derived glycodelin impairs in vitro dendritic cell maturation," J.Immunother. 32 (5): 492-497.

2012: Rampf, Elisabeth, "Der Einfluss von Glykodelin O aus Ovarialkarzinomaszites auf Dendritische Zellen," Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Regina Brunnhuber
Nationalität: deutsch
Geburtsdatum: 07.11.1983 in Starnberg
Status: ledig

Tätigkeit

seit 2011: Assistenzärztin der Inneren Medizin im Klinikum Erding mit Dorfen
2005-2007: Clinical Associate bei Harrison Clinical Research
2004: Studentische Hilfskraft in der Neurophysiologie bei Prof. Dr. M. Meyer

Studium

11.08.2010: Approbation als Ärztin
14.04.2010: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“ (1,5)
10/2004-04/2010: Studium der Humanmedizin, Klinik, LMU München
09/2004: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“ (1,66)
10/2002-09/2004: Studium der Humanmedizin, Vorklinik, LMU München

Stipendien

2004-2008: Stipendiatin des Cusanuswerks
2002-2004: Stipendiatin bei e-fellows.net
2005: Oscar-Karl Forster Bücherstipendium
2008: Erasmus-Stipendium

Praktisches Jahr

08/2008-12/2008: 3.Tertial: Innere Medizin, Medizinischen Poliklinik der LMU München
04/2008-07/2008: 2.Tertial: Chirurgie, Ospedale S.Orsola di Bologna, Italien
2/2007-03/2008: 1.Tertial: Pädiatrie, Haunersches Kinderspital der LMU München

Famulatur

- 02/2010: Famulatur in der Neurologie in der Marianne Strauss Klinik, Kempfenhausen
- 12/2009: Famulatur in der Psychiatrie im Isar-Amper-Klinikum, München 11/2007: Famulatur in der Neurologie im Krankenhaus Harlaching, München
- 03/2007: Famulatur am Institut für Humangenetik der TU München
- 08/2005: Famulatur in der onkologischen Praxis Dr. Schmidkonz, Erding
- 09/2005: Famulatur in der Pneumologie, Lainzer Krankenhaus, Wien
- 03/2006: Famulatur in der Frauenklinik der LMU München

Schulische Ausbildung

- 2002: Allgemeine Hochschulreife, Note "sehr gut" (1,1)
- 1995-2002: Pestalozzi-Gymnasium, München

Sprachen

- | | |
|-------------|-----------------|
| Deutsch | Muttersprache |
| Italienisch | fließend |
| Englisch | flüssig |
| Französisch | Grundkenntnisse |

Mitgliedschaften

- Immunis.ev Gründungsmitglied
- Marburger
- Bund deutscher Internisten

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

"Der Einfluss von Glycodelin A auf Dendritische Zellen und die adaptive Immunantwort"

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 06.01.2015

Regina Brunnhuber